

**REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG
EINER AMINOPEPTIDASE
AUF ASCITES-HEPATOMZELLEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Angelika Barmetler
aus Singen

1978

**REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG
EINER AMINOPEPTIDASE
AUF ASCITES-HEPATOMZELLEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.



vorgelegt von
Angelika Barmetler
aus Singen

1978

Dekan: Prof.Dr.Peter Schopfer

Leiter der Arbeit: Prof.Dr.Dietrich Keppler

Referent: Prof.Dr.Kurt Jungermann

Korreferent: Prof.Dr.Hans Grisebach

Tag der Verkündigung des Prüfungsergebnisses:



INHALT

A	EINLEITUNG	1
B	ERGEBNISSE	4
1.	Messung von Enzymaktivitäten auf intakten Zellen und im Zellhomogenat	4
2.	Lokalisation der Aminopeptidase-Aktivität auf der Zelloberfläche	6
2.1.	Enzymatische Hydrolyse von markiertem Glycyl-leucin durch intakte Zellen	6
2.2.	Hemmung der enzymatischen Aktivität auf der Zelloberfläche durch Aminopeptidase-Antikörper	11
2.3.	Solubilisierung des Enzyms von der Zelloberfläche unter weitgehender Erhaltung der Zellviabilität	11
3.	Solubilisierung der Aminopeptidase von der Zelloberfläche	14
3.1.	Verwendung von Proteinasen	14
3.2.	Verwendung von Detergentien	16
3.3.	Versuche zur Viabilität der Zellen während der Solubilisierung	18
3.3.1.	Mikroskopisches Bild und Trypan-Blau-Färbung	18
3.3.2.	Messung der intrazellulären Adenin-nucleotide	18
3.3.3.	Austritt cytosolischer Enzymaktivitäten ins Inkubationsmedium	19
4.	Reinigung der Aminopeptidase	21
4.1.	Reinigung des Papain-solubilisierten Enzyms	21
4.1.1.	Ammoniumsulfat-Gradienten-Solubilisierung der mit Papain abgelösten Plasmamembranproteine	21
4.1.2.	Affinitätschromatografie an Concanavalin A-Sepharose	22
4.1.3.	Semi-präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23

4.2. Reinigung des Lubrol-solubilisierten Enzyms	24
4.2.1. Affinitätschromatografie an Concanavalin A-Sepharose	24
4.2.2. Ionenaustauschchromatografie an QAE-Sephadex	24
4.2.3. Gelpermeationschromatografie an Sephadex G-200	25
5. Charakterisierung der gereinigten Enzyme	27
5.1. Elektrophoretische Daten	27
5.2. Enzymatische Eigenschaften	28
5.2.1. Stabilität	28
5.2.2. pH-Optimum	29
5.2.3. Substrat-Spezifität	29
5.2.4. Inhibitoren	32
5.3. Immunologische Untersuchungen	35
5.3.1. Immunpräzipitation im Doppeldiffu- sionstest	35
5.3.2. Reinigung der IgG-Fractionen über Protein A-Sepharose	36
5.3.3. Hemmung der Enzymaktivität durch die gereinigten Antikörper	36
5.4. Physikalisch-chemische Eigenschaften	37
5.4.1. Abschätzung des Molekulargewichts	37
5.4.2. Kohlenhydrat-Analyse	38
6. Vergleich der Eigenschaften der gereinigten Enzyme mit denjenigen des membrangebundenen Oberflächenenzym	38
C DISKUSSION	42
D ZUSAMMENFASSUNG	52
E EXPERIMENTELLES	54
1. Enzyme und Chemikalien	54
2. Methodische Grundbedingungen für Zellversuche	55
2.1. Zellmaterial	55
2.2. Gewinnung und Waschung der Zellen	55

2.3. Iso-osmolale Puffer	56
2.4. Zellfeuchtgewichte	57
2.5. Homogenisation	57
3. Bestimmung von Enzymaktivitäten	58
3.1. Aminopeptidase	58
3.1.1. Aminosäure-p-nitroanilide als Substrate	58
3.1.2. Oligopeptide als Substrate	58
3.2. Endopeptidase	60
3.2.1. Künstliche Substrate	60
3.2.2. Proteine als Substrate	60
3.3. γ -Glutamyltransferase	60
3.4. Nucleotidpyrophosphatase und Alkalische Phosphatase	61
3.5. 5'-Nucleotidase	61
3.6. Laktat-dehydrogenase	62
3.7. Hexokinase	62
4. Proteinbestimmung	63
5. Trypan-Blau-Färbung	63
6. Messung der intrazellulären Adenin-nucleotide	63
6.1. Bestimmung von ATP	63
6.2. Bestimmung von ADP und AMP	64
7. Solubilisierung der Aminopeptidase von der Zelloberfläche	64
7.1. Proteinasen	64
7.2. Detergentien	65
8. Reinigung der Aminopeptidase	65
8.1. Reinigung des Papain-solubilisierten Enzyms	65
8.1.1. Ammoniumsulfat-Gradienten-Solubilisierung	65
8.1.2. Affinitätschromatografie an Concanavalin A-Sepharose	65
8.1.3. Semi-präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese	66

8.2. Reinigung des Lubrol-solubilisierten Enzyms	66
8.2.1. Affinitätschromatografie an Concanavalin A-Sepharose	66
8.2.2. Ionenaustauschchromatografie an QAE-Sephadex	66
8.2.3. Gelchromatografie an Sephadex G-200	66
9. Polyacrylamid-Gelelektrophoresen	67
9.1. Analytische Gelelektrophoresen ohne SDS	67
9.2. SDS-Gelelektrophoresen	68
10. Gelpermeationschromatografie zur Molekulargewichts- bestimmung	69
11. Kohlenhydratanalyse	70
11.1. Bestimmung der Hexosen	70
11.2. Bestimmung der N-Acetyl-hexosamine	70
11.3. Bestimmung der Neuraminsäuren	71
12. Immunologische Untersuchungen	72
12.1. Herstellung von Antiseren gegen die gereinigten Amino-peptidasen	72
12.2. Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony	72
12.3. Reinigung der IgG-Frak-tionen	72
12.4. Hemmung der Amino-peptidase-Aktivität durch die gereinigten Antikörper	73
12.4.1. Hemmung des gereinigten P-Enzyms	73
12.4.2. Hemmung der Enzymaktivität auf der Zelloberfläche	73
13. Messung der Spaltung von radioaktiv markiertem Glycyl-leucin durch intakte Zellen	74
13.1. Enzymatische Hydrolyse von $[1-^{14}\text{C}]$ Gly-Leu	74
13.2. Enzymatische Hydrolyse von Gly- $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ Leu	74
13.3. Radiopapierchromatografische Trennung und Analyse der Reaktionsprodukte	75
F LITERATUR	76

Abkürzungen

AMP, ADP, ATP	Adenosin-5'-mono-, -di-, -triphosphat
BAPA	N-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid
BTP	N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
Mgac ₂	Magnesiumacetat
NAD ⁺ , NADH	oxydiertes bzw. reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NANA	N-Acetyl-neuraminsäure
PAS	Perjodsäure/Schiff's Reagens
pCMBS	p-Chloro-mercuri-phenylsulfonat
POPOP	2,2'-p-Phenylen-bis-(5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TMP	Thymidin-5'-monophosphat
TRA	Triäthanolamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (= $\mu\text{mol/min}$)

Für die mit Papain solubilisierete Amino-peptidase wird die Abkürzung P-Enzym, für die mit Lubrol PX solubilisierete Amino-peptidase die Abkürzung L-Enzym verwendet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550803_0048

A EINLEITUNG

Dem proteolytischen Apparat der Zelle kommt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Enzymspiegeln, der Vernichtung fehlerhafter und zellfremder Peptidketten und der Bereitstellung von Aminosäuren für Neusynthesen zu. Der Angriff an den Proteinemolekülen erfolgt dabei auf zweierlei Weise: Endopeptidasen greifen im Innern der Moleküle an und zerlegen sie zunächst in kürzerkettige Peptide, Exopeptidasen hydrolysieren dagegen sequentiell endständige Peptidbindungen. Je nach Angriffspunkt an der Peptidkette unterscheidet man dabei Amino- und Carboxypeptidasen. Eine Aminopeptidase spaltet als typische Exopeptidase die N-terminale Aminosäure von einer Peptidkette ab.

Aminopeptidase-Aktivitäten wurden in den verschiedensten Organismen entdeckt. *E. coli* enthält mehrere Enzyme unterschiedlicher Spezifität (45,58,78,80,86), von denen eines an den Ribosomen (78) und eines im periplasmatischen Raum lokalisiert ist (45,58). Diese "Oberflächenaminopeptidase" besitzt nicht nur Exo-, sondern auch Endopeptidase-Eigenschaften.

In Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) sind bisher drei Aminopeptidasen beschrieben (85): Aminopeptidase I ist ein Zinkenzym, das Dipeptide, Polypeptide und Proteine angreift (56). Aminopeptidase II, ebenfalls ein Metallenzym, hydrolysiert nur Di- und Tetrapeptide (56). Eine dritte Aminopeptidase der Hefe wurde als Zinkenzym charakterisiert und in den Vakuolen lokalisiert (23).

Aminopeptidasen sind in einer Vielzahl von Säugetierzellen vorhanden. So wurde beispielsweise in beinahe allen menschlichen Geweben Aminopeptidase-Aktivität gefunden (46,72), die höchsten Aktivitäten treten im Darm und in der Niere auf. Im einzelnen wurden die Enzyme aus menschlicher Leber (6) und Niere (7), der Ratten- (41,75) und Schweineniere (31,81,82), sowie der Darm-schleimhaut der Ratte (25,37,39) und des Schweins (49,54,55) charakterisiert. Ausführlich beschrieben wurde eine Aminopeptidase aus Rinderaugenlinsen (22,29,51,76).

Die bisherigen Untersuchungen zur Topologie der tierischen Enzyme zeigten, daß die Amino-peptidase-Moleküle häufig in der "brush-border"-Region und ihre enzymatische Aktivität wahrscheinlich an der Oberfläche der Zellen lokalisiert sind (25,28,37,47). Möglicherweise tragen Amino-peptidasen als typische "integrale" Membranproteine einen Baustein zum "fluid mosaic" (60,67) der Plasmamembran bei.

Membranproteine sind im Gegensatz zu den Lipiden, welche die eigentliche "Trennwand" der Zellmembranen bilden, die Vermittler der dynamischen Prozesse zwischen extrazellulärem Raum und Zellinnerem. Mit ihren hydrophoben Regionen eingebettet in die Lipid-Doppelschicht, können sie vielfältige biologische Aufgaben übernehmen. Dazu gehören neben der Beteiligung an der Membranstrukturbildung vor allem Transport, Informationsübertragung und mindestens teilweise auch enzymatische Aktivität. Zur Erfüllung ihrer Vermittlertaufgabe müssen die Proteine asymmetrisch, d.h. funktionell gerichtet und fixiert sein. Für diese transversale Fixierung in der Plasmamembran sorgen außer der amphipathischen Natur der Proteine auch die Kohlenhydratanteile, die nach außen gerichtet sind und durch ihren hydrophilen Charakter ein "Umklappen" des Moleküls verhindern.

Eine asymmetrische Anordnung weisen auch Enzymaktivitäten auf. Enzyme der Plasmamembran, deren aktives Zentrum zum Extrazellulärraum hin gerichtet ist, werden als Ekto-Enzyme bezeichnet (14). Eine Ekto-Natur konnte z.B. für die 5'-Nucleotidase und die Nucleotidpyrophosphatase verschiedener Zellen gezeigt werden (1,10,15,27,59,64,70,77).

Für Zelloberflächenstudien mit ganzen Zellen ist eine intakte Plasmamembran unerläßlich. Da bei der Präparation von Einzelzellen aus solidem Gewebe immer die Gefahr der teilweisen Zerstörung oder Beschädigung der Zelloberflächenstruktur besteht, erscheinen Zellen, die in Suspensionskultur wachsen, als besonders geeignet. Verwendet wurden vor allem Leukozyten (1,15) und Ascites-Zellen (33). Für die vorliegende Arbeit über das Oberflächenenzym Amino-peptidase wurden AS-30D-Zellen

gewählt, von einem chemisch induzierten Hepatom abgeleitete, in Ratten kultivierte Ascites-Zellen (68). Diese Zellen besitzen ausgeprägte Microvilli, also Regionen, in denen im Darm und in der Niere Aminopeptidasen lokalisiert werden konnten (25,28,37,47).

Auf AS-30D-Ascites-Hepatomzellen wurde neben einer Gruppe von nucleotidspaltenden Enzymen (35) auch eine Aminopeptidase-Aktivität entdeckt. Die Charakterisierung dieses Ekto-Enzyms beinhaltet folgende Fragestellung :

1. Wie läßt sich die Ekto-Eigenschaft der Aminopeptidase auf den Ascites-Zellen nachweisen?

Von DePierre und Karnovsky wurden Kriterien erarbeitet, die für die Ekto-Natur eines Membranenzyms sprechen (14,15). Am Beispiel der Aminopeptidase sollen verschiedene Möglichkeiten aufgezeigt und diskutiert werden.

2. Wie läßt sich das membrangebundene Ekto-Enzym von der intakten Zelle unter Erhalt seiner enzymatischen Aktivität solubilisieren?

Zur Reinigung und Charakterisierung der Aminopeptidase ist eine Solubilisierung des in der Lipid-Doppelschicht "gelösten" Proteins nötig. Detergentien und Proteinasen können hierzu verwendet werden. Im vorliegenden Fall war es notwendig, Kompromiß-Bedingungen zur Solubilisierung zu erarbeiten, unter denen sowohl die intakte Zelle als auch die Aktivität des solubilisierten Enzyms erhalten bleiben.

3. Wieweit gleicht der Zustand des solubilisierten und aus seiner natürlichen Umgebung entfernten Enzyms demjenigen "in situ" ? Durch die Solubilisierung verlieren Membranenzyme ihre katalytische Orientierung. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, daß sie durch die Behandlung mit Detergentien oder Proteinasen in ihren Eigenschaften verändert werden. Deshalb sollen die auf verschiedene Weise solubilisierten und gereinigten Aminopeptidasen charakterisiert werden und sowohl die beiden Formen untereinander als auch, soweit möglich, mit dem membrangebundenen Ekto-Enzym auf der intakten Zelle verglichen werden.

B ERGEBNISSE

1. Messung von Enzymaktivitäten auf intakten Zellen und im Zellhomogenat

Aktivitäten von Ekto-Enzymen der Plasmamembran können direkt in einer Suspension intakter Zellen gemessen werden (1,15,59,70,77). Ein im Medium gelöstes Substrat wird von dem in den Extrazellulärraum gerichteten aktiven Zentrum gebunden und umgesetzt. Vergleicht man die auf diese Weise gemessene Aktivität mit derjenigen des Zellhomogenats, so ergibt sich ein Hinweis auf die Orientierung des Enzyms (77): Ist die Aktivität auf den intakten Zellen etwa gleich groß wie im Homogenat, so kann man annehmen, daß ein Ekto-Enzym vorliegt. Hat man es dagegen mit einem ins Cytosol gerichteten oder im Zellinnern lokalisierten Enzym zu tun, so ist im Homogenat eine erheblich höhere Aktivität zu erwarten, da das aktive Zentrum beim Ganzzellversuch einem im Medium gelösten Substrat nicht zugänglich ist. Eine solche Gegenüberstellung kann allerdings nur dann als beweisend gelten, wenn die Möglichkeit der Permeation des Substrats durch die Plasmamembran ausgeschlossen wurde.

Die Messungen einiger Enzymaktivitäten intakter und beschallter AS-30D-Zellen sind in Tab.1 zusammengefaßt. Für die Plasmamembranenzyme Nucleotidpyrophosphatase und 5'-Nucleotidase, deren Lokalisation auf der Oberfläche von Leberzellen (10,27,64,77), Leukozyten (1,15), Fettzellen (59) und Glioma-Zellen (70) nachgewiesen werden konnte, ist danach ebenso wie für die Amino-peptidase auch auf AS-30D-Zellen eine Ekto-Natur wahrscheinlich. Endopeptidase-Aktivität ist dagegen hauptsächlich im Zellinnern der Ascites-Zellen zu finden; die Spaltung von Leucyl-alanin im Homogenat resultiert wahrscheinlich aus der Summe der Amino-peptidase-Aktivität der Plasmamembran und intrazellulären Peptidase-Aktivitäten.

Enzym	Substrat	pH	Aktivität	
			Intakte Zellen	Homogenat
			mmol / min · kg	
Aminopeptidase	Leucin-p-nitroanilid	7.5	0.72	0.70
		7.8	0.72	0.88
	Glycin-p-nitroanilid	7.5	0.20	0.17
		7.8	0.16	0.15
	Leucyl-alanin	7.8	2.9	16.5
γ -Glutamyl-transferase	γ -Glutamin-p-nitroanilid	7.5	0.10	0.37
Endopeptidase	N-Acetyl-alanin-p-nitroanilid	7.5	0.54	1.62
		7.8	0.42	1.54
	N-Benzoyl-arginin-p-nitroanilid	7.5	0.04	0.07
	N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid	7.5	0.01	0.09
5'-Nucleotidase	AMP	7.4	0.22	0.21
Alkalische Phosphatase	p-Nitro-phenylphosphat	7.4	0.002	0.04
Nucleotid-pyrophosphatase	p-Nitro-phenyl-TMP	7.5	1.71	1.63

Tab.1

Enzymaktivitäten auf intakten AS-30D-Zellen und im Homogenat

Die Aktivitäten wurden durch direkte Inkubation (15 - 20 min) der intakten bzw. beschallten Zellen mit dem Substrat bei 25 °C bestimmt. Die Messungen wurden bei physiologischen pH-Werten durchgeführt, nicht beim pH-Optimum der einzelnen Enzyme. Alle Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen (Streuung 5 - 10%), die Aminopeptidase-Aktivität ist über die untersuchten Transplantationsgenerationen gemittelt (Streuung 5%).

2. Lokalisation der Amino-peptidase-Aktivität auf der Zelloberfläche

2.1. Enzymatische Hydrolyse von markiertem Glycyl-leucin durch intakte Zellen

Verwendet man zur Messung der enzymatischen Hydrolyse auf intakten Zellen radioaktiv markierte Substrate, so kann man den topologischen Ablauf der Reaktion zu jedem Zeitpunkt exakt verfolgen. Für das Enzymsystem der Nucleotidhydrolasen auf AS-30D-Zellen wurde auf diese Weise gezeigt, daß die Substrate nicht von den Zellen aufgenommen werden und die Reaktionsprodukte zu über 99.9% extrazellulär auftreten (35).

Um die Lokalisation der Amino-peptidase auf der Oberfläche von AS-30D-Zellen abzusichern, wurden die intakten Zellen mit ^{14}C -markiertem Glycyl-leucin inkubiert. Dabei wurde einmal $[^{14}\text{C}]$ Gly-Leu und einmal Gly- $[^{14}\text{C}]$ Leu als Substrat eingesetzt, um zu unterscheiden, ob die N-terminale Aminosäure nach der enzymatischen Hydrolyse schneller ins Zellinnere gelangt als die C-terminale. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 10, 20, 30$ min wurden Proben entnommen und die Zellen vom Medium durch Zentrifugation getrennt. Im Medium sowie in den mit Perchlorsäure aufgeschlossenen Zellen wurden Substrate und Reaktionsprodukte der enzymatischen Hydrolyse durch Radiopapierchromatografie aufgetrennt und quantitativ bestimmt (Abb.1 und 2).

In Abb.3 ist der Zeitverlauf der Glycyl-leucin-Spaltung auf intakten Zellen dargestellt. Die Enzymaktivität betrug bei der Hydrolyse von $[^{14}\text{C}]$ Gly-Leu (Zusatz von 10 mmol/l Glycin im Medium) 1.30 mmol/min·kg, bei der Spaltung von Gly- $[^{14}\text{C}]$ Leu (Zusatz von 10 mmol/l Leucin) nur 0.56 mmol/min·kg (37°C). Freies Leucin bewirkt demnach eine deutliche Hemmung der Amino-peptidase-Aktivität auf der Zelloberfläche.

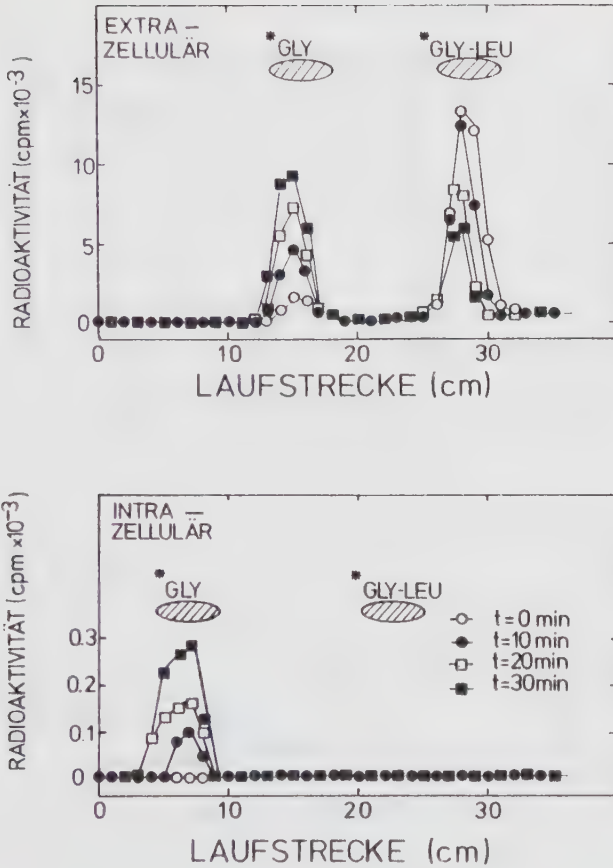


Abb.1

Papierchromatografische Trennung der Reaktionsprodukte der $[^{14}\text{C}]$ Gly-Leu-Spaltung durch intakte Zellen

Die Zellen wurden bei 37°C mit $[1-^{14}\text{C}]$ Gly-Leu (0.2 mCi/l , $260 \text{ } \mu\text{mol/l}$) inkubiert. Das Medium enthielt 10 mmol/l Glycin. Die Produktanalyse der zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommenen Proben erfolgte durch Radiopapierchromatografie im Vergleich mit unmarkierten Standards (Laufmittel: $n\text{-Propanol/H}_2\text{O}$, $7/3$, v/v; die Chromatografiedauer betrug 16 bzw. 12^h Stunden).

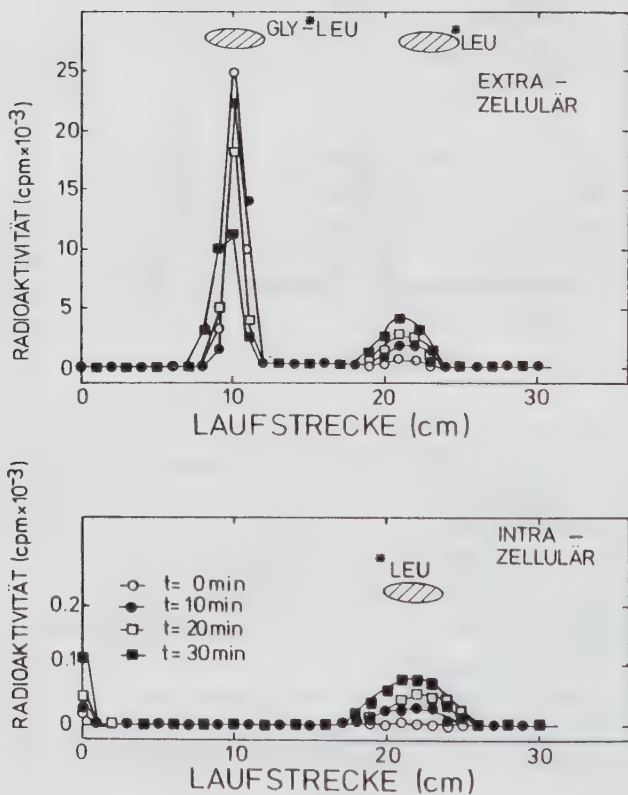


Abb.2

Papierchromatografische Trennung der Reaktionsprodukte der Gly-[¹⁴C]Leu-Spaltung durch intakte Zellen

Die Zellen wurden bei 37°C mit Gly-[U-¹⁴C]Leu (0.2 mCi/l, 260 µmol/l) inkubiert. Das Medium enthielt 10 mmol/l Leucin. Die Produktanalyse der zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommenen Proben erfolgte durch Radiopapierchromatografie im Vergleich mit unmarkierten Standards (Laufmittel: n-Butanol/Pyridin/0.1N HCl, 5/3/2, v/v/v; die Chromatografiedauer betrug 18 Stunden).

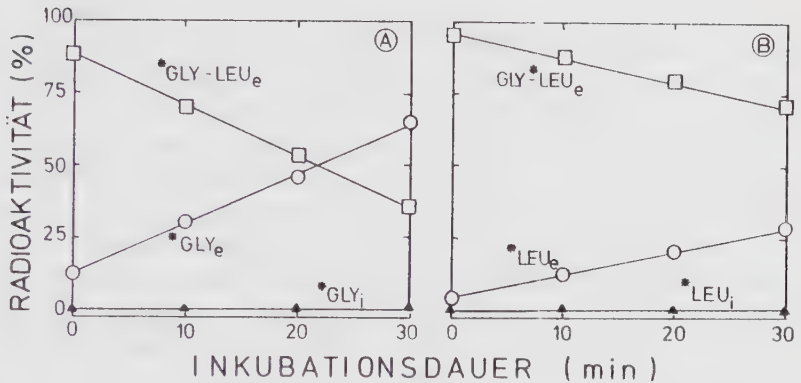


Abb.3

Zeitverlauf der Glycyl-leucin-Spaltung auf intakten Zellen

(A) $[1-^{14}\text{C}]\text{Gly-Leu}$

(B) $\text{Gly}-[U-^{14}\text{C}]\text{Leu}$

Die einzelnen Punkte wurden durch Integration der den verschiedenen Substanzen zugeordneten Kurvenabschnitte in Abb.1 und 2 gewonnen. Index e bedeutet extra-, Index i intrazellulär.

Die Radioaktivität blieb bei beiden Versuchen zu über 99.5% im extrazellulären Raum, auch die bei der enzymatischen Spaltung entstehenden radioaktiven Aminosäuren befinden sich annähernd quantitativ im Medium (Tab.2). Zu keinem Zeitpunkt der an der Zelloberfläche ablaufenden enzymatischen Hydrolyse tritt intrazelluläres Dipeptid auf. Die mit der Zeit stattfindende Permeation der freien Aminosäure ins Zellinnere läuft für das N-terminale Glycin nicht schneller ab als für das C-terminale Leucin.

Zu diesen Versuchen wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, das prüfen sollte, ob während der Inkubation der Zellen eine teilweise Solubilisierung der Amino-peptidase-Aktivität eintrat.

Inkubations- dauer	Gesamtradioaktivität			[¹⁴ C] -Glycin		
	extrazellulär	intrazellulär		extrazellulär	intrazellulär	
min	cpm $\times 10^{-6}$	cpm $\times 10^{-3}$	%	cpm $\times 10^{-6}$	cpm $\times 10^{-3}$	%
0	18.7	4.9	0.03	1.48	0.90	0.07
10	17.5	12.2	0.07	4.18	8.23	0.20
20	18.5	33.6	0.18	6.37	21.70	0.34
30	17.9	43.0	0.24	8.92	33.97	0.38

Inkubations- dauer	Gesamtradioaktivität			[¹⁴ C] -Leucin		
	extrazellulär	intrazellulär		extrazellulär	intrazellulär	
min	cpm $\times 10^{-6}$	cpm $\times 10^{-3}$	%	cpm $\times 10^{-6}$	cpm $\times 10^{-3}$	%
0	17.8	18.6	0.10	0.46	0.50	0.11
10	18.7	24.0	0.13	1.55	2.62	0.17
20	18.5	27.4	0.15	2.50	5.32	0.21
30	15.4	43.0	0.26	3.69	8.57	0.23

Tab. 2

Radioaktivitätsverteilung während der Hydrolyse von radioaktiv markiertem Glycyl-leucin auf AS-30D-Zellen

(A) [¹⁻¹⁴C]Gly-Leu

(B) Gly-[U-¹⁴C]Leu

Die Zellen wurden bei 37°C mit radioaktiv markiertem Di-peptid (0.2 mCi/l, 260 µmol/l) inkubiert. Die jeweils markierte Aminosäure wurde dem Medium in freier und nicht markierter Form in einer Konzentration von 10 mmol/l zugesetzt. Die Gesamtradioaktivität der zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommenen Proben wurde durch direkte Zählung der Überstände (s. Experimentelles) in Triton-Toluol-Szintillator bestimmt, die Radioaktivität der Reaktionsprodukte durch Integration der entsprechenden Flächen in Abb. 1 und 2.

Unter den gleichen Bedingungen wie bei der Glycyl-leucin-Spaltung wurden die Zellen ohne Substrat inkubiert und in den zu den gleichen Zeiten gewonnenen Überständen auf enzymatische Aktivität gegenüber Leucin-p-nitroanilid getestet. Unter den angegebenen Bedingungen ist auch nach 30 min im Medium keine Aktivität nachweisbar.

2.2. Hemmung der enzymatischen Aktivität auf der Zelloberfläche durch Aminopeptidase-Antikörper

Da Antikörper als die Plasmamembran nicht permeierende Substanzen angesehen werden (14), kann der Nachweis der Bindung des Antikörpers an sein in der Zelloberfläche verankertes Antigen die Ekto-Eigenschaft des antigenen Enzyms demonstrieren. Diese Bindung kann zu einer Hemmung der enzymatischen Aktivität führen. Für die 5'-Nucleotidase wurde dieser Effekt an Fettzellen (59) und Leber-Plasmamembranen (27), für die Aminopeptidase an Nieren- (28) und Darmschleimhaut-Vesikeln (47,74) beobachtet.

Um die Hemmbarkeit der Aminopeptidase-Aktivität auf AS-30D-Zellen durch Antikörper testen zu können, wurde ein Kaninchen gegen die durch Papain solubilisierete und zur Homogenität gereinigte Aminopeptidase immunisiert. Ebenso wurden im Kaninchen Antikörper gegen eine andere Membranenzymfraktion (Nucleotidpyrophosphatase-Fraktion, s. Abb. 7) entwickelt, um einen Kontrollversuch auf unspezifische Hemmung parallel durchführen zu können. Die so erhaltenen γ -Globuline wurden über eine Protein A-Sephrose-Säule gereinigt (s. Abschnitt 5.3.2.).

AS-30D-Zellen wurden mit den Aminopeptidase- und mit den Kontroll-Antikörpern 30 min bei 37°C inkubiert; anschließend wurde die enzymatische Aktivität der Aminopeptidase auf den intakten Zellen gemessen. Das Ergebnis ist in Abb. 4 dargestellt:

Die gegen die Aminopeptidase entwickelten Antikörper bewirkten eine Hemmung der zellgebundenen Aktivität bis zu etwa 65%, die Kontroll- γ -Globuline hatten in gleichen Konzentrationen keinen Einfluß auf die Aminopeptidase-Aktivität.

2.3. Solubilisierung des Enzyms von der Zelloberfläche unter weitgehender Erhaltung der Zellviabilität

Ekto-Enzyme können in aktiver Form von außen aus der Plasmamembran intakter Zellen oder aus Vesikeln herausgelöst werden, ohne daß die Lipid-Doppelschicht zerstört wird. Als wirkungsvoll solubilisierende Agentien wurden vor allem Trypsin (42),

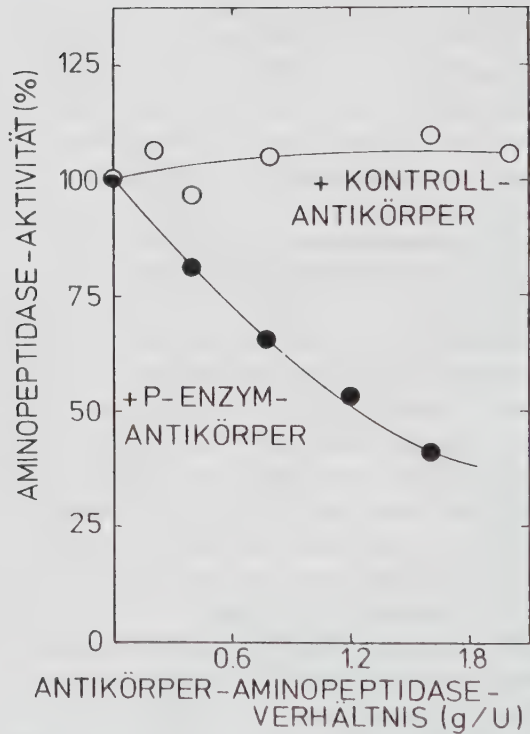


Abb.4

Hemmung der Aminopeptidase-Aktivität auf intakten Zellen durch Antikörper

AS-30D-Zellen in einer Verdünnung von etwa 1:800 (4×10^6 Zellen/l) wurden 30 min bei 37°C mit gereinigten γ -Globulinen inkubiert. Danach wurde die Aminopeptidase-Aktivität auf den Zellen mit Leucin-p-nitroanilid als Substrat gemessen.

Papain (16,48,52,69) und Salze von Gallensäuren (32) eingesetzt. Die Struktur der Vesikeln bzw. der ganzen Zellen bleibt während der Solubilisierung im Wesentlichen erhalten.

Um die Aminopeptidase unter möglichst weitgehender Erhaltung der AS-30D-Zellen von der Plasmamembran abzulösen, erwies sich eine Behandlung der intakten Zellen mit Papain als am effektivsten (s.Abschnitt 3.). Bis zu 14% der gesamten Aktivität konnten durch milde Papainverdauung von der Zelloberfläche solubilisiert werden.

Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Viabilität nach der proteolytischen Behandlung mit Zellen verglichen, die unter sonst identischen Bedingungen keiner enzymatischen Verdauung ausgesetzt waren. Als Kriterien wurden herangezogen (69):

1. Die Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop und die Trypan-Blau-Färbung
2. Die intrazellulären Adenin-nucleotid-Gehalte
3. Der Austritt cytosolischer Enzyme ins Medium

Die Tabellen in 3.3. zeigen, daß sich die mit Papain behandelten Zellen in allen drei Punkten nur unwesentlich von den Kontrollen unterschieden. Unter den gewählten Bedingungen (s.Abschnitt 3.1.) für die Solubilisierung der Aminopeptidase von der Oberfläche ganzer AS-30D-Zellen blieb die Viabilität der Zellen im Wesentlichen gewahrt.

Die Möglichkeit, Aminopeptidase von der intakten Zelle mit Papain zu solubilisieren, war ein weiteres Argument für die Ekto-Natur des Enzyms.

3. Solubilisierung der Amino-peptidase von der Zelloberfläche

Eine relativ selektive Solubilisierung unter möglichst weitgehender Erhaltung der intakten Zelle ist auch wichtig für die nachfolgende Reinigung des Enzyms, da sie durch eine grobe Trennung von intrazellulärem Material bereits einen ersten Reinigungsschritt darstellt. Grundsätzlich können zur Solubilisierung von Membranenzymen Proteinasen oder Detergentien eingesetzt werden.

3.1. Verwendung von Proteinasen

Die solubilisierende Wirkung verschiedener Proteinasen auf die Amino-peptidase auf intakten AS-30D-Zellen wurde untersucht. Nach Tab.3 erhielt man mit Papain den größten Anteil der gesamten auf den Zellen vorhandenen Aktivität an gelöstem, aktivem Enzym.

Proteinase	Konzentration	Solubilisierte Aktivität	
	g / l	$\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{kg}$	% der Gesamtaktivität
Papain	0.9	102	14
Bromelain	4.5	68	9
Trypsin	3.6	37	5
Chymotrypsin	0.4	13	1.8
Enzygel-papain	4.5		
Kontrolle	-		

Tab.3

Solubilisierung der Amino-peptidase auf AS-30D-Zellen durch Proteinasen

Die Zellen wurden in einer Verdünnung von etwa 1:50 (6×10^9 Zellen/l) in Papain-Solubilisierungs-Puffer aufgenommen und 45 min bei 20°C mit der Proteinase inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und im Überstand die solubilisierte Aktivität mit Leucin-p-nitroanilid als Substrat bestimmt.

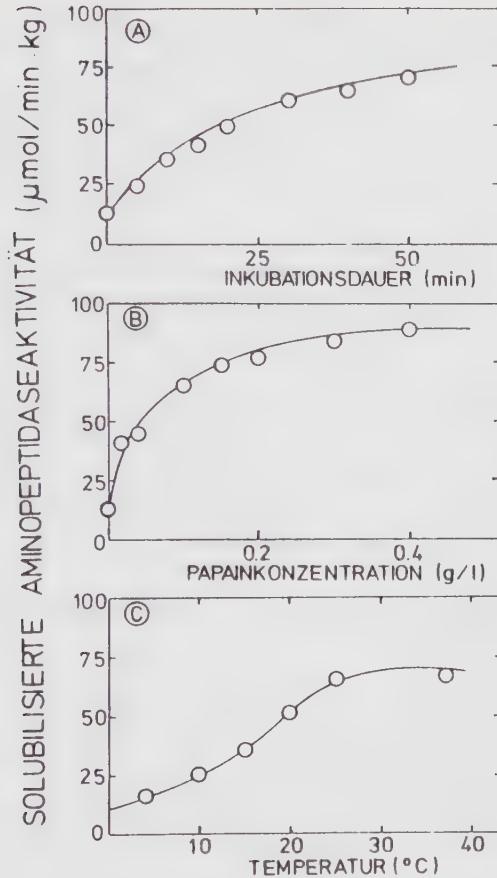


Abb.5

Solubilisierung der Amino-peptidase mit Papain in Abhängigkeit von

- (A) der Inkubationsdauer
- (B) der Papainkonzentration
- (C) der Temperatur

Die Zellen wurden in Papain-Solubilisierungs-Puffer mit der Protease inkubiert; die Zellkonzentration betrug 6×10^9 Zellen/l. Die jeweils nicht variierten Bedingungen waren:

Inkubationsdauer 30 min; Papainkonzentration 0.4 g/l; Temperatur 20°C.

Die solubilisierte Amino-peptidase-Aktivität ist in μmol/min angegeben und auf das Zellfeuchtgewicht in kg bezogen.

In Abb.5 ist die Solubilisierung mit Papain abhängig von der Inkubationsdauer, der Temperatur und der Papainkonzentration dargestellt. Die drei Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf: Die solubilisierete Aminopeptidase-Aktivität nähert sich einem Grenzwert, der bei 12 - 14% der Gesamt-Oberflächenaktivität liegt.

Unter Berücksichtigung der Erhaltung der Viabilität der Zellen während der Solubilisierung (s.Abschnitt 3.3.) wurden folgende Bedingungen für die Gewinnung des aktiven Enzyms von der Zelloberfläche gewählt:

Zellkonzentration:	6×10^9 Zellen/l in Papain-Solubilisierungs-Puffer (pH 7.0)
Papainkonzentration:	50 mg/l (30000 U/g gegenüber N-Benzoyl-arginin-äthylester)
Temperatur:	20°C
Inkubationsdauer:	30 min

Unter diesen Bedingungen wurden 6 - 7% der Gesamt-Oberflächenaktivität solubilisiert.

3.2. Verwendung von Detergentien

Membrangebundene Enzyme können auch mit Hilfe von Detergentien solubilisiert werden (30). Für die Solubilisierung der Aminopeptidase von der Plasmamembran der AS-30D-Zellen erwies sich Lubrol PX als wirkungsvollstes Detergens (s.Abb.6). Lubrol PX ist ein mit einem langkettigen primären Alkohol kondensiertes Polyäthylenglykol, also ein nicht-ionisches Detergens. Insgesamt wurde erheblich mehr Aktivität solubilisiert als mit Proteinase (bis zu 80% der Gesamtaktivität), der Nachteil hierbei ist aber eine erhebliche Beschädigung der Plasmamembran und damit erhebliche Beeinträchtigung der Zellviabilität (s.Abschnitt 3.3.).

Die gewählten Bedingungen zur Gewinnung der löslichen Ekto-Aminopeptidase sind ein Kompromiß zwischen Solubilisierungseffizienz und Erhaltung der intakten Zellen:

Zellkonzentration: 5×10^9 Zellen/l in Lubrol-
Solubilisierungs-Puffer (pH 7.3)
Lubrolkonzentration: 0.2 g/l
Temperatur: 4°C
Inkubationsdauer: 30 min

Unter diesen Bedingungen wurden 60 - 70% der Gesamt-Oberflächen-
aktivität solubilisiert.

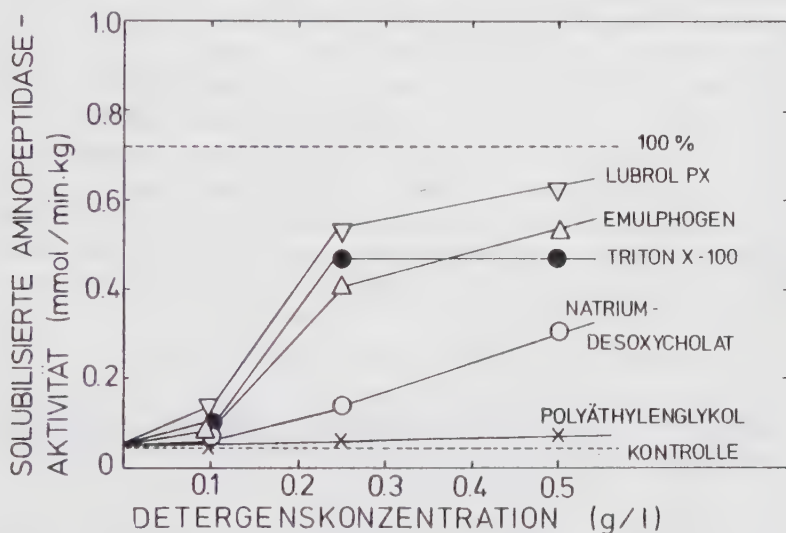


Abb.6

Solubilisierung der Amino-peptidase auf
AS-30D-Zellen durch Detergentien

Die Zellen wurden in einer Verdünnung von etwa 1:60
(5×10^9 Zellen/l) in Lubrol-Solubilisierungs-Puffer auf-
genommen und 30 min bei 4°C mit dem Detergens inkubiert.
Die Zellen wurden abzentrifugiert und im Überstand die
solubilisierte Aktivität mit Leucin-p-nitroanilid als
Substrat bestimmt. Die solubilisierte Aktivität ist in
mmol/min angegeben und auf das Zellfeuchtgewicht in kg
bezogen.

Da beide Solubilisierungsprozesse das Enzym in seiner Struktur
und seinen Eigenschaften verändern können, wurden sowohl das mit
Papain als auch das mit Lubrol solubilisierte Enzym gereinigt
und charakterisiert.

3.3. Versuche zur Viabilität der Zellen während der Solubilisierung

3.3.1. Mikroskopisches Bild und Trypan-Blau-Färbung

Das mikroskopische Bild der mit Papain behandelten Zellen unterschied sich nur durch eine teilweise Aggregation der Zellen von dem der Kontrollen. Trypan-Blau wurde von 94% der Kontrollzellen und 87% der mit Papain angedauten Zellen ausgeschlossen.

Im Gegensatz zu anderen Detergentien ließ Lubrol PX in einer Konzentration von 0,2 g/l die Zellen als solche erkennbar bleiben, es trat keine Zellauflösung und keine Aggregation ein. Die fast quantitative Färbung mit Trypan-Blau zeigte allerdings, daß eine schwere Schädigung der Plasmamembran eingetreten sein mußte. Von den ohne Lubrol inkubierten Kontrollzellen nahmen 10% die Färbung an.

3.3.2. Messung der intrazellulären Adenin-nucleotide

Intrazelluläre Adenin-nucleotid-Gehalte sind ein Maß für die biologische Funktionsfähigkeit einer Zelle (21). Hohe ATP-Spiegel, ein hohes ATP/ADP-Verhältnis und eine hohe Adenylate energy charge⁺(5) sind das Resultat eines intakten Energiestoffwechsels.

Die in Tab.4 zusammengefaßten Ergebnisse erlauben die Aussage, daß eine milde Papain-Verdauung die Viabilität der AS-30D-Zellen unbeeinflusst läßt; die Werte der mit Papain behandelten Zellen unterschieden sich kaum von denjenigen der Kontrollzellen, die den gleichen Inkubationsbedingungen ausgesetzt waren. Es fällt jedoch auf, daß beide ATP-Werte erheblich unter dem unter Kulturbedingungen gemessenen Normwert von 3.66 mmol/kg (36) liegen, was wahrscheinlich auf den unphysiologisch niedrigen pH-Wert des Papain-Solubilisierungs-Puffers von 7.0 zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zur Papain-Behandlung entlassen die Zellen während der Solubilisierung mit Lubrol den Überwiegenden Teil ihrer Adenin-nucleotide ins Medium, was in Übereinstimmung mit den

Inkubations- bedingungen		ATP	ADP	AMP	ΣAdenosin- phosphate	ATP ADP	EC ⁺
		mmol / kg					
30min, 20°C, pH 7.0	- Papain	0.84	1.20	0.38	2.41	0.72	0.60
	+ Papain	0.89	1.08	0.57	2.54	0.82	0.56
30min, 4°C, pH 7.4	- Lubrol	0.73	1.67	0.96	3.36	0.44	0.47
	+ Lubrol	0.09	0.08	0.04	0.21	1.13	0.62

⁺Adenylate energy charge : $\frac{ATP + 1/2 ADP}{(ATP + ADP + AMP)}$

Tab.4

Adenosinphosphat-Gehalte von AS-30D-Zellen unter den Bedingungen der Solubilisierung mit Papain und Lubrol

Die genauen Inkubationsbedingungen sind in 3.1. bzw. 3.2. angegeben, die Bestimmung der Adenosinphosphate ist unter "Experimentelles" beschrieben.

Trypan-Blau-Versuchen auf schwerwiegende Membranschädigungen schließen läßt. Das ATP/ADP-Verhältnis und die Adenylate energy charge aus den wenigen verbliebenen Nucleotiden erscheinen deshalb wenig relevant. Der ATP-Gehalt der Kontrollzellen liegt auch hier mit nur etwa 20% des Kontrollwertes unter physiologischen Bedingungen wesentlich zu niedrig, in diesem Fall wohl bedingt durch die Inkubationstemperatur von 4°C.

3.3.3. Austritt cytosolischer Enzymaktivitäten ins Inkubationsmedium

Eine intakte Plasmamembran verhindert den Austritt cytosolischer Enzyme in den extrazellulären Raum. Während der Solubilisierung der Amino-peptidase von der Zelloberfläche sollte deshalb die Aktivität dieser Enzyme im Medium nicht signifikant ansteigen.

		Laktat-Dehydro- genase-Aktivität	
		mmol/ min·kg	%
Ⓐ	Homogenat	105	100
	Kontrollzellen vor der Inkubation	13	12
	nach der Inkubation	22	21
	Lubrol-behandelte Zellen	109	104
		Hexokinase- Aktivität	
		mmol/ min·kg	%
Ⓑ	Homogenat	9.1	100
	Kontrollzellen vor der Inkubation	0.4	5
	nach der Inkubation	0.7	8
	Papain-behandelte Zellen	1.2	14

Tab.5

Aktivitäten cytosolischer Enzyme im Medium während der Solubilisierung der Amino-peptidase

Ⓐ mit Lubrol

Ⓑ mit Papain

Nach der Solubilisierung wurden die Zellen abzentrifugiert und im Überstand die Enzymaktivitäten bei 25°C gemessen (s. "Experimentelles").

Die Enzymaktivitäten sind in mmol/min angegeben und auf das Zellfeuchtgewicht in kg bezogen.

Die Behandlung von intakten AS-30D-Zellen mit Lubrol führt zum quantitativen Austritt der cytosolischen Laktat-dehydrogenase ins Inkubationsmedium (Tab.5). Die Plasmamembran ist mindestens an einigen Stellen so schwer beschädigt, daß sie ihre Barrierenfunktion nicht mehr ausüben kann.

Da Papain die Laktat-dehydrogenase durch proteolytische Verdauung inaktiviert, wurde für den Fall der Papain-Solubilisierung der Austritt der Papain-resistenten Hexokinase ins Medium gemessen (Tab.5). Der Vergleich mit den Kontrollen zeigte auch hier, daß die Zellen die Papain-Behandlung relativ intakt überstehen.

4. Reinigung der Amino-peptidase

4.1. Reinigung des Papain-solubilisierten Enzyms

4.1.1. Ammoniumsulfat-Gradienten-Solubilisierung der mit Papain abgelösten Plasmamembranproteine

Die durch Papain von der Zelloberfläche solubilisierten Membranproteine konnten durch eine kontinuierliche Ammoniumsulfat-Gradienten-Fraktionierung (40) aufgetrennt werden. Dabei wurden die Proteine in Gegenwart des Trägermaterials Celite 545 mit Ammoniumsulfat ausgefällt (80% Sättigung), in eine Chromatographiesäule gefüllt und mit absteigendem, linearem Ammoniumsulfat-Gradienten zwischen 80 und 0% Sättigung wieder heraus-solubilisiert (Abb.7).

Im Eluat erschienen zwei Hauptpeaks: Der erste enthielt die Amino-peptidase-Aktivität (bei etwa 60% Ammoniumsulfat-Sättigung), der zweite die Membranenzyme Nucleosidpyrophosphatase und Alkalische Phosphatase (etwa zwischen 45 und 35% Ammoniumsulfat-Sättigung). Bei ca. 30 - 25% Sättigung an Ammoniumsulfat wurde das zur Solubilisierung verwendete Papain gefunden.

Die Fraktionen mit Amino-peptidase-Aktivität wurden vereinigt und über Sephadex G-10 entsalzt. Es wurde eine 6-fache Anreicherung des Enzyms erzielt.

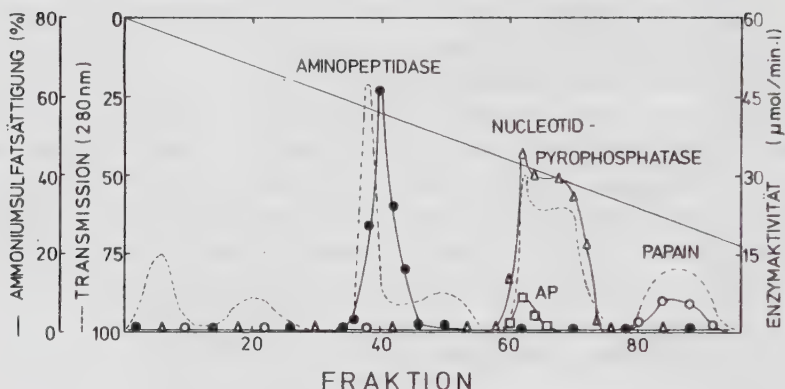


Abb.7

Ammoniumsulfat-Gradienten-Solubilisierung der mit Papain abgelösten Membranproteine an Celite 545

Im Eluat wurden folgende Enzymaktivitäten gemessen:

- Aminopeptidase; Substrat Leucin-p-nitroanilid
- Δ-Δ-Δ Nucleotidpyrophosphatase + Alkalische Phosphatase; Substrat p-Nitrophenyl-TMP
- Alkalische Phosphatase; Substrat p-Nitrophenylphosphat
- o-o-o Papain; Substrat N-Benzoyl-arginin-p-nitroanilid

Alle Aktivitäten wurden bei 25°C und im pH-Optimum der Enzyme bestimmt. Details der Säulenchromatografie sind unter "Experimentelles" beschrieben.

4.1.2. Affinitätschromatografie an Concanavalin A-Sepharose

Die Bindung der Aminopeptidase an das Lectin Concanavalin A deutete darauf hin, daß ein Glykoprotein vorlag. Diese reversible Bindung konnte zu einer Affinitätschromatografie ausgenutzt werden.

Die entsalzte Proteinlösung wurde auf eine Concanavalin A-Sepharose-Säule aufgetragen und mit einem linearen α-Methyl-mannosid-

Gradienten eluiert (Abb.8). Bei Routine-Reinigungen wurde auf den Gradienten verzichtet und mit 50 mmol/l α -Methyl-mannosid eluiert. Dieser Reinigungsschritt erbrachte den größten Anreicherungsfaktor (8-fach).

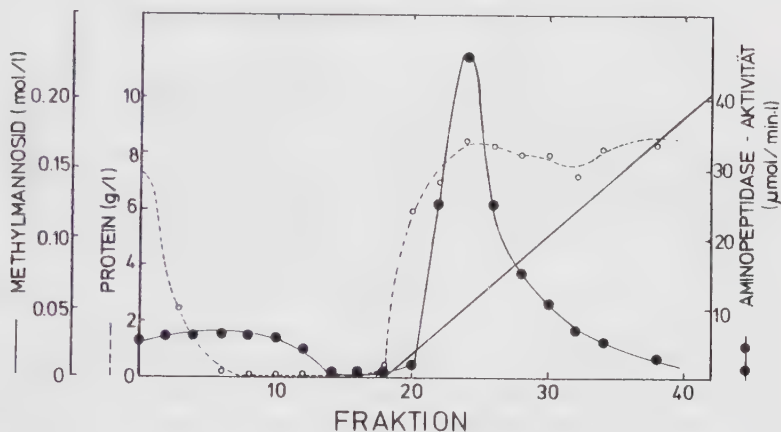


Abb.8

Affinitätschromatografie der Amino-peptidase an Concanavalin A-Sepharose (Einzelheiten der Durchführung unter "Experimentelles")

4.1.3. Semi-präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach der Affinitätschromatografie an Concanavalin A-Sepharose waren in der analytischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei pH 9.0 drei Glykoproteine mit deutlich verschiedenen R_f -Werten zu erkennen. Als letzter Reinigungsschritt für die Amino-peptidase bot sich deshalb eine semi-präparative Gelelektrophorese an, die in 8%igen Polyacrylamid-Gelen bei pH 9.0 und 4°C durchgeführt wurde. Das Enzym wurde nach beendeter Elektrophorese aus 1 mm dicken Gelscheibchen eluiert. Es stellte sich in der analytischen

Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei drei verschiedenen pH-Werten (pH 8.0, 9.0 und 10.3) homogen, PAS-positiv und enzymatisch aktiv dar (s.auch Tab.7).

Die Reinigung der Papain-solubilisierten Amino-peptidase ist in Tab.6 zusammengefaßt.

4.2. Reinigung des Lubrol-solubilisierten Enzyms

Da sich die mit Lubrol PX solubilisierete Amino-peptidase in ihrem Löslichkeitsverhalten und ihrer pH-Stabilität von dem Papain-solubilisierten Enzym unterschied, konnten die Ammoniumsulfat-Gradienten-Solubilisierung und die semi-präparative Gelelektrophorese bei pH 9.0 zur Reinigung nicht übernommen werden.

4.2.1. Affinitätschromatografie an Concanavalin A-Sepharose

Der bei der Solubilisierung mit Lubrol erhaltene zellfreie Überstand wurde direkt über die Concanavalin A-Sepharose-Säule gepumpt. Die Elution der Amino-peptidase erfolgte in diesem Fall unter Verzicht auf den Gradienten mit einer α -Methyl-mannosid-Konzentration von 0.2 mol/l. Die Affinitätschromatografie lieferte auch bei der Reinigung des Lubrol-solubilisierten Enzyms den höchsten Anreicherungs-faktor (30-fach).

4.2.2. Ionenaustauschchromatografie an QAE-Sephadex

Die gewonnene Glykoproteinfraktion der Plasmamembran wurde an QAE-Sephadex weiter aufgetrennt. Die Elution des an den Ionenaustauscher gebundenen Materials erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten zwischen 0 und 0.5 mol/l NaCl. Neben der Amino-peptidase erschien als weiteres Plasmamembranenzym eine Dipeptidyl-Amino-peptidase im Eluat. Die Amino-peptidase wurde bei diesem Schritt etwas über 3-fach angereichert.

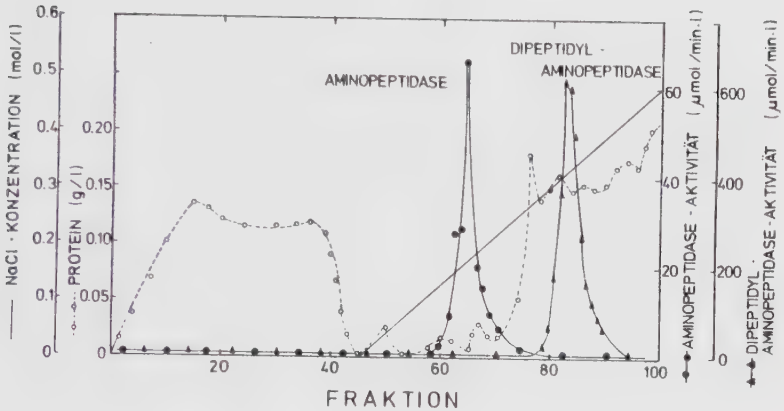


Abb.9

Ionenaustauschchromatografie der Lubrol-solubilisierten, über Concanavalin A-Sephadrose partiell gereinigten Plasmamembranglykoproteine an QAE-Sephadex

Die Enzymaktivitäten wurden bei 25°C und pH 7.2 gemessen:

- Amino-aminopeptidase; Substrat Leucin-p-nitroanilid
- ▲-▲-▲ Dipeptidyl-Amino-aminopeptidase; Substrat Alanin-p-nitroanilid, inaktiv gegenüber Leucin-p-nitroanilid

Im einzelnen ist die Chromatografie unter "Experimentelles" beschrieben.

4.2.3. Gelpermeationschromatografie an Sephadex G-200

Als letzter Schritt zu einem elektrophoretisch homogenen Enzym diente eine Gelchromatografie an Sephadex G-200 (Anreicherung 6-fach). Eine Übersicht über die Reinigung ist in Tab.6 gegeben.

Reinigung der Papain-solubilisierten Amino-peptidase

Reinigungsschritt	Gesamt-aktivität	Gesamt-protein	Spez. Aktivität	Anreicherung	Aus-beute
	$U \times 10^3$	$g \times 10^3$	U/g		%
Papain-solubilisierter Überstand	1650	304	5.5	1	100
Ammoniumsulfat-Gradienten-Solubilisierung	880	26	33	6	53
Affinitätschromatografie an Concanavalin A-Sephadex	560	2.2	260	47	34
Semi-präparative Gel-elektrophorese bei pH 9.0	150	0.3	510	93	9

Reinigung der Lubrol-solubilisierten Amino-peptidase

Reinigungsschritt	Gesamt-aktivität	Gesamt-protein	Spez. Aktivität	Anreicherung	Aus-beute
	$U \times 10^3$	$g \times 10^3$	U/g		%
Lubrol-solubilisierter Überstand	24000	2665	8.8	1	100
Affinitätschromatografie an Concanavalin A-Sephadex	7070	27	260	30	29
Ionenaustauschchromatografie an QAE-Sephadex	1700	2.0	830	94	7
Gelpermeationschromatografie an Sephadex G-200	710	0.14	4900	550	3

Tab.6

Übersicht über die Reinigungen der mit Papain bzw. Lubrol solubilisierten Amino-peptidase

Die Enzymaktivität wurde mit Leucin-p-nitroanilid als Substrat bei 25°C gemessen. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (50).

5. Charakterisierung der gereinigten Enzyme

5.1. Elektrophoretische Daten

Die elektrophoretischen Daten der beiden gereinigten Enzyme in 8%igen Polyacrylamid-Gelen sind in Tab.7 zusammengefaßt:
Beide Proteine sind mit Perjodsäure/Schiff's Reagens anfärbbar, sind also Glykoproteine. Die R_F -Werte für pH 8.0 und 9.0 sind ähnlich, ein deutlicher Unterschied fällt auf bei pH 10.3, wo das L-Enzym beinahe doppelt so schnell wandert wie das P-Enzym. Nach der Elektrophorese bei pH 9.0 und 10.3 war das L-Enzym nicht mehr aktiv.

	pH 8.0		pH 9.0		pH 10.3	
	P	L	P	L	P	L
R_F -Wert	0.20	0.24	0.27	0.31	0.24	0.44
PAS	+	+	+	+	+	+
Enzymatische Aktivität	+	+	+	-	+	-

Tab.7

Elektrophoretische Daten der P- und L-Aminopeptidase

Die Elektrophoresen wurden in 8%igen Polyacrylamid-Gelen unter Wasserkühlung durchgeführt. Nach beendeter Elektrophorese (5 mA/Gel) wurden die Gele mit Coomassie-Blau, Perjodsäure/Schiff's Reagens und Leucin-p-nitroanilid als Substrat angefärbt (s."Experimentelles").

5.2. Enzymatische Eigenschaften

5.2.1. Stabilität

Die Papain-solubilisierete Aminopeptidase ist durch bemerkenswerte Stabilität gekennzeichnet: Bei Aufbewahrung bei 4°C und pH 7.8 wurde sie mit einer Halbwertszeit von etwa 4 Wochen inaktiviert; Aufbewahrung bei -20°C verursachte einen Aktivitätsverlust von ca. 10%.

Die Lubrol-solubilisierete Aminopeptidase war bei pH 7.2 am stabilsten; sie besaß bei diesem pH und 4°C eine Halbwertszeit von etwa 10 Tagen. Detergentien beschleunigten die Inaktivierung erheblich, weshalb bei Reinigung und Aufbewahrung auf Lubrol-Zusatz verzichtet wurde. Bei -20°C wurde das Enzym vollständig inaktiviert.

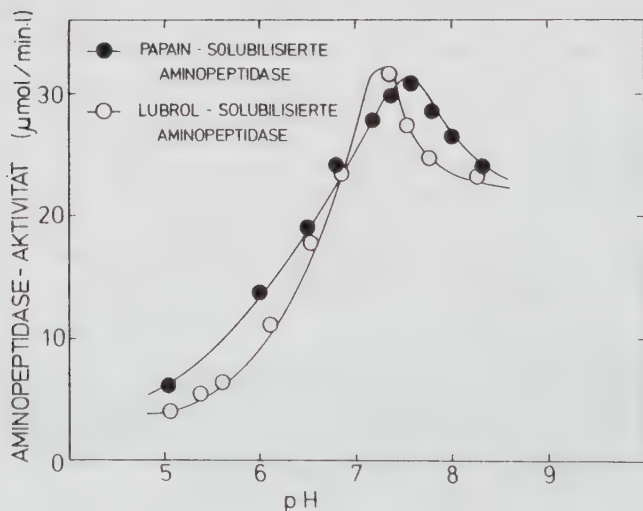


Abb. 10

pH-Abhängigkeit der P- und L-Amino-peptidase-Aktivität

Die Enzymaktivitäten wurden in 0.1M Natriumphosphat-Puffer gegenüber Leucin-p-nitroanilid bei 25°C gemessen.

Beide Enzyme zeigten nach einigen Wochen mehrere schwache, schneller wandernde Banden in der analytischen Gelelektrophorese, was auf eine sukzessive Selbstverdauung der Amino-peptidase schließen läßt.

5.2.2. pH-Optimum

Die pH-Profile der beiden Enzyme zeigten einen etwas unterschiedlichen Verlauf: Die P-Amino-peptidase entwickelte ihre maximale Aktivität gegenüber Leucin-p-nitroanilid bei pH 7.6, die L-Amino-peptidase bei pH 7.2 (Abb.10).

5.2.3. Substrat-Spezifität

Beide Enzyme spalten p-Nitroanilide von Aminosäuren, bevorzugt diejenigen von Leucin und Alanin (Tab.8). Die Aktivität gegenüber N-substituierten Aminosäure-p-nitroaniliden ist sehr gering.

Aminosäure- p-nitroanilid	Rel. Spaltungs- geschwindigkeit	
	P-Enzym	L-Enzym
Leucin-	1.00	1.00
Alanin-	0.65	0.12
Glycin-	0.29	0.01
Lysin-	0.27	0.08
Glutamin (α)-	0.08	0.05
Glutamin (γ)-	0.02	0.01
Tyrosin-	0.28	0.08
Prolin-	0.16	0.03
N-Acetyl-alanin-	0.02	0.01
N-Benzoyl-arginin-	< 0.01	< 0.01
N-Benzoyl- Phe-Val-Arg-	< 0.01	< 0.01
Alanyl-alanin-	< 0.01	< 0.01

Tab.8

Spaltungsspezifität der Amino-peptidasen gegenüber p-Nitroaniliden verschiedener Aminosäuren

Alle Aktivitäten wurden bei einer Substratkonzentration von 2.7 mmol/l, bei 25°C und dem pH-Optimum der Enzyme (7.6 bzw. 7.2) bestimmt.

Auch eine Endopeptidase-Aktivität gegenüber Proteinen ist nicht vorhanden. Substrate wie Hämoglobin, Casein oder Azocoll wurden nicht meßbar umgesetzt. Da die Spaltung von Alanyl-alanin-p-nitroanilid schrittweise vom aminoterminalen Ende her erfolgt, so daß freies p-Nitroanilin erst nach erheblicher Verzögerung meßbar wird, war eine Klassifizierung der Enzyme als Amino-peptidasen klar. Im Gegensatz dazu spaltet die durch Lubrol PX solubilisierbare Dipeptidyl-Amino-peptidase (s. Abb. 9) das Substrat Alanyl-alanin-p-nitroanilid in freies Dipeptid und p-Nitroanilin, sie besitzt keine Aktivität gegenüber Aminosäure-p-nitroaniliden.

Die Geschwindigkeit der katalytischen Hydrolyse in Tab. 8 wurde bei einer Substratkonzentration von 2.7 mmol/l bestimmt. Für die P-Amino-peptidase liegt diese Konzentration für beinahe alle umgesetzten Substrate im Bereich der Sättigung, für das L-Enzym sind dagegen bei höheren Substratkonzentrationen teilweise höhere Aktivitäten zu erwarten. Einige K_m -Werte für die P-Amino-peptidase sind in Tab. 9 zusammengefaßt. Die Michaeliskonstanten des L-Enzyms lagen um etwa eine Größenordnung darüber und waren wegen der schlechten Löslichkeit der p-Nitroanilide nicht exakt zu bestimmen.

Aminosäure- p-nitroanilid	K_m
	mmol/l
Leucin-	0.22
Alanin-	0.39
Glycin-	1.4
Lysin-	0.44
Glutamin (α)-	1.6
Tyrosin-	0.16
Prolin-	2.0

Tab. 9

Michaeliskonstanten der P-Amino-peptidase (25°C, pH 7.6)

Aminosäure-p-nitroanilide sind künstliche Substrate, denen die Aminopeptidase in vivo nicht gegenübersteht. Um den natürlichen Gegebenheiten näher zu kommen, wurde die Aktivität des Enzyms gegenüber Oligopeptiden untersucht. Gemessen wurde die Freisetzung von N-terminalem Alanin aus Oligoalaninen verschiedener Kettenlänge (Abb.11).

Als Ergebnis zeigte sich, daß bei steigender Kettenlänge der K_m -Wert abnimmt, längerkettige Oligopeptide also bessere Substrate sind. Die Maximalgeschwindigkeit nähert sich wahrscheinlich einem Grenzwert.

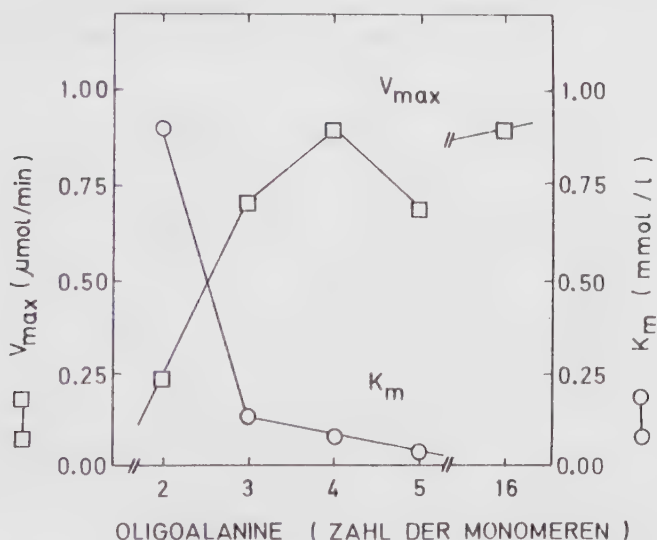


Abb.11

Kinetische Daten der P-Aminopeptidase für die Abspaltung der N-terminalen Alanin-Gruppe aus Oligoalaninen verschiedener Kettenlänge

Die enzymatische Hydrolyse erfolgte bei pH 7.8 und 25°C. Das freigesetzte Alanin wurde enzymatisch mit Alanin-dehydrogenase bestimmt. Aus Gründen der Löslichkeit mußte für (Ala)₁₆ die D,L-Verbindung verwendet werden, so daß eine K_m -Bestimmung nicht möglich war.

5.2.4. Inhibitoren

Für die Aktivität der Amino-peptidase war ein Zusatz von Metallionen nicht erforderlich. EDTA hatte fast keinen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms, Schwermetallionen erwiesen sich als wirk-same Inhibitoren (Tab.10). Freie Aminosäuren als Reaktionsprodukte der enzymatischen Hydrolyse hemmen in höheren Konzentrationen die Enzymaktivität.

Inhibitor	Konzentration	Rel.Enzymaktivität	
		P-Enzym	L-Enzym
	mmol/l		
----	---	1.00	1.00
EDTA	10	0.93	0.93
Mg ²⁺	10	0.74	0.71
Ca ²⁺	10	0.59	0.35
Mn ²⁺	10	0.28	0.32
Zn ²⁺	5	0.07	0.07
Cu ²⁺	5	0	0
Hg ²⁺	0.05	0	0
pCMBS	0.05	0	0
Glycin	10	0.89	0.84
Alanin	10	0.78	0.96
Leucin	10	0.57	0.82

Tab.10

Einfluß von Metallionen und Amino-säuren auf die enzymatische Akti-vität der Amino-peptidase

Alle Aktivitäten wurden bei 25°C und im pH-Optimum (pH 7.6 bzw. 7.2) mit Leucin-p-nitroanilid als Substrat gemessen.

Die Amino-peptidase zeigte die für Zinkenzyme typische Hemmung (79) durch o-Phenanthrolin (Abb.11A). EDTA und der dem o-Phenanthrolin strukturanaloge Nicht-Chelatbildner Benzo-[h]-chinolin hatten bei gleichen Konzentrationen keinen signifikanten Einfluß auf die Enzymaktivität.

Durch Zugabe von Zn^{2+} -Ionen ließ sich die durch o-Phenanthrolin gehemmte Amino-peptidase-Aktivität weitgehend wieder herstellen: Bei einem Mol-Verhältnis Zn/o -Phenanthrolin von 1/3 erlangte das Enzym 80 - 90% seiner ursprünglichen Aktivität zurück (Abb.11B). Bei höherem molarem Zn/o -Phenanthrolin-Verhältnis sank die Aktivität wieder auf den Ausgangswert des o-Phenanthrolin-gehemmten Enzyms, die Hemmung der Aktivität durch freie Zn^{2+} -Ionen tritt in den Vordergrund. Einen fast identischen Kurvenverlauf fand Himmelhoch für das Nierenenzym (31).

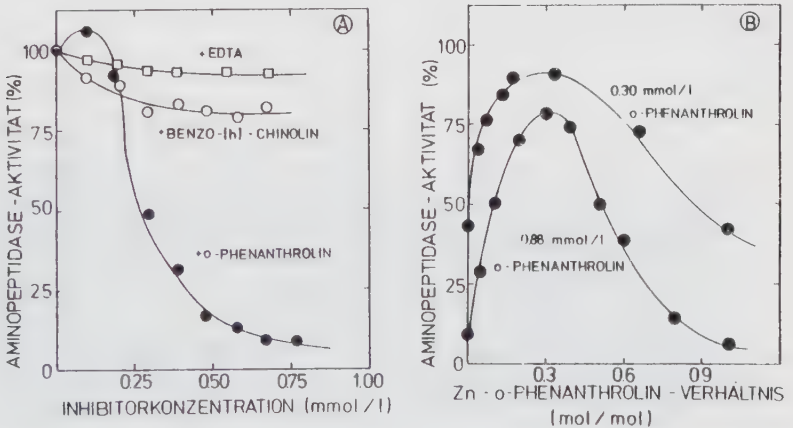


Abb.12

- (A) Hemmung der L-Amino-peptidase durch o-Phenanthrolin
- (B) Reaktivierung der durch o-Phenanthrolin gehemmten L-Amino-peptidase durch Zn^{2+} -Ionen

Alle Enzymaktivitäten wurden bei 25°C und pH 7.2 mit Leucin-p-nitroanilid als Substrat gemessen.

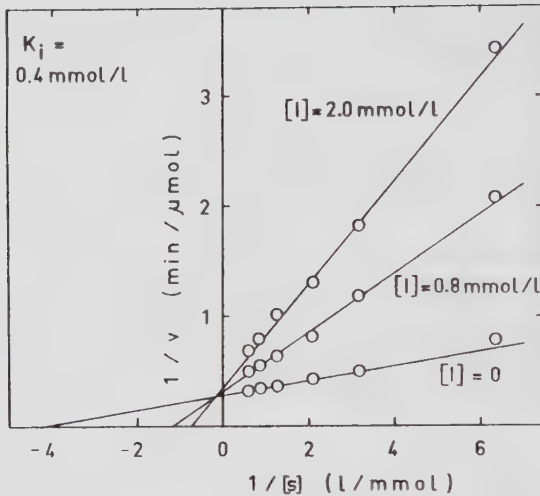


Abb.13

Lineweaver-Burk-Diagramm für die Hemmung der P-Amino-peptidase durch Puromycin

Die Enzymaktivitäten wurden bei 25°C und pH 7.8 mit Leucin-p-nitroanilid als Substrat bei drei verschiedenen Inhibitor-konzentrationen (0, 0.8, 2.0 mmol/l) bestimmt.

Das Antibiotikum Puromycin ist ein Strukturanalogon der Aminoacyl-t-RNA. Für die Amino-peptidase scheint es mit seiner freien Amino-gruppe einen Peptidrest zu simulieren, der als Substrat erkannt wird und die enzymatische Hydrolyse von Leucin-p-nitroanilid kompetitiv hemmt (Abb.13). Die Hemmkonstante wurde aus dem Line-weaver-Burk-Diagramm zu 0.4 mmol/l berechnet.

5.3. Immunologische Untersuchungen

5.3.1. Immunpräzipitation im Doppeldiffusionstest

Die Überprüfung der Identität von P- und L-Enzym wurde immunologisch durchgeführt. Dazu wurden gegen beide gereinigten Amino-peptidasen im Kaninchen Antikörper entwickelt. Im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest bildeten die Antikörper mit dem jeweils eigenen Antigen eine einheitliche Präzipitationsbande (Abb.14). Außerdem konnte eine immunologische Reaktion zwischen L-Aminopeptidase und den P-Enzym-Antikörpern nachgewiesen werden, was auf mindestens teilweise immunologische Identität des Lubrol-solubilisierten Enzyms mit dem Papain-solubilisierten schließen läßt.

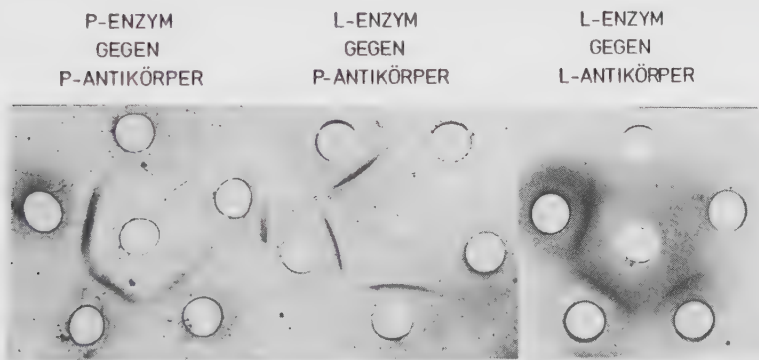


Abb.14

Ouchterlony-Doppeldiffusionstests der gereinigten Amino-peptidasen gegen ihre Antiseren

Das zentrale Loch wurde jeweils mit 10 µl (etwa 20 mU) gereinigtem Enzym, die peripheren Löcher mit 10 bis 20 µl Antiserum beladen. Die Präzipitationslinien erschienen nach 24 - 48 Stunden bei 4 °C. Sie wurden mit Amidoschwarz angefärbt.

5.3.2. Reinigung der IgG-Fractionen über Protein A-Sepharose

Zur Entfernung von störender Amino-peptidase-Aktivität im Kaninchenserum wurden die Antikörper gereinigt. Protein A-Sepharose bindet spezifisch an IgG-Antikörper und kann deshalb zu einer Affinitätschromatografie verwendet werden. Die so gereinigten IgG-Fractionen bildeten mit den Antigenen die gleichen Präzipitationsbanden wie in Abb.14. Sie besaßen keine nachweisbare Amino-peptidase-Aktivität mehr.

5.3.3. Hemmung der Enzymaktivität durch die gereinigten Antikörper

Die gereinigten P-Enzym-Antikörper hemmten die Aktivität der P-Amino-peptidase bis zu 85%. Eine Kontroll-IgG-Präparation (s.Abschnitt 2.2.) bewirkte dagegen eine leichte Aktivierung (Abb.15). Die L-Amino-peptidase wurde im Gegensatz dazu von ihren Antikörpern nicht inhibiert.

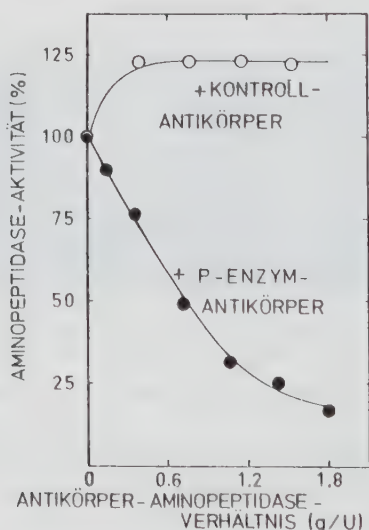


Abb.15

Hemmung der P-Amino-peptidase durch Antikörper

Gereinigte Antikörper wurden 30 min bei 37°C mit dem Enzym inkubiert, anschließend wurde die Aktivität bei 37°C mit Leucin-p-nitroanilid als Substrat gemessen.

5.4. Physikalisch-chemische Eigenschaften

5.4.1. Abschätzung des Molekulargewichts

Die Molekulargewichtsbestimmung durch Gelpermeationschromatografie an Sephadex G-200 ergab für die L-Aminopeptidase einen Wert von 195000 Dalton, für die P-Aminopeptidase den etwas kleineren Wert von 180000 Dalton (Abb.16).

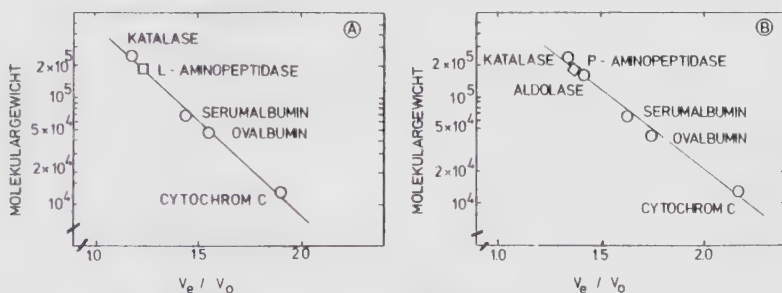


Abb.16

Molekulargewichtsbestimmung der L- und P-Aminopeptidase durch Gelpermeationschromatografie an Sephadex G-200

Die Chromatografie wurde in einem 2×100 cm - Gelbett durchgeführt, das mit einem 0.1M Tris-HCl-Puffer pH 7.0 (0.1M NaCl, 5mM Mgac₂) äquilibriert war. Im Eluat wurde die Aminopeptidase durch Aktivitätsmessung, die Eichproteine mit einem Durchflußphotometer bei 280 nm bestimmt. V_0 wurde mit Dextranblau 2000 ermittelt.

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (13% Acrylamid) zeigten beide Enzyme eine einheitliche Bande bei 70000 Dalton, was einer Untereinheit, d.h. einem nicht aggregierten Monomeren des Proteins entsprechen dürfte.

Da Glykoproteine sowohl in Sephadex-Gelen wegen der Wechselwirkung der Zuckerkomponenten (3) als auch im allgemeinen in der SDS-Gelelektrophorese (12) langsamer wandern als reine Proteine mit gleichem Molekulargewicht, ist der Wert für das Gesamtprotein

wahrscheinlich etwas zu niedrig, der Wert für die Monomeren dagegen eher zu hoch. Die Berücksichtigung dieser Verschiebungen läßt einen Molekülverband mit einem totalen Molekulargewicht von etwa 200000 vermuten, der aus 3 oder 4 identischen Untereinheiten von 50000 - 70000 Dalton aufgebaut ist.

5.4.2. Kohlenhydrat-Analyse

Wegen der geringen zur Verfügung stehenden Enzymmengen ließ sich der Kohlenhydrat-Anteil der Aminopeptidase nur semi-quantitativ angeben. Der Gehalt an freien Hexosen wurde mit dem Phenol-Schwefelsäure-Reagens (17), die N-Acetyl-hexosamine nach 6-stündiger Hydrolyse bei 93°C in 4N HCl nach Elson-Morgan (18) bestimmt; die Neuraminsäuren wurden nach 30-minütiger Hydrolyse bei 85°C in 0.1N H₂SO₄ mit Thiobarbitursäure nach der Methode von Aminoff (2) gemessen.

Für die L-Aminopeptidase ergaben sich folgende ungefähre Kohlenhydrat-Gehalte (in Gewichtsprozent des Gesamtzyms):

Hexosen	25 - 30%
N-Acetyl-hexosamine	3 - 5 %
Neuraminsäuren	2 %

6. Vergleich der Eigenschaften der gereinigten Enzyme mit denjenigen des membrangebundenen Oberflächenenzym

Die enzymatischen und immunologischen Eigenschaften der isolierten Aminopeptidasen lassen sich direkt mit denen des zellgebundenen Oberflächenenzym vergleichen.

Die Michaeliskonstante für Alanin-p-nitroanilid betrug auf intakten Zellen 0.66 mmol/l gegenüber 0.32 mmol/l für das gereinigte P-Enzym. In Abb.17 ist eine Gegenüberstellung der verschiedenen Enzyme in Bezug auf ihre Substrat-Spezifität gegenüber Aminosäure-p-nitroaniliden dargestellt. Es zeigten sich deutliche Unterschiede vor allem in der Aktivität gegenüber Alanyl-alanin-

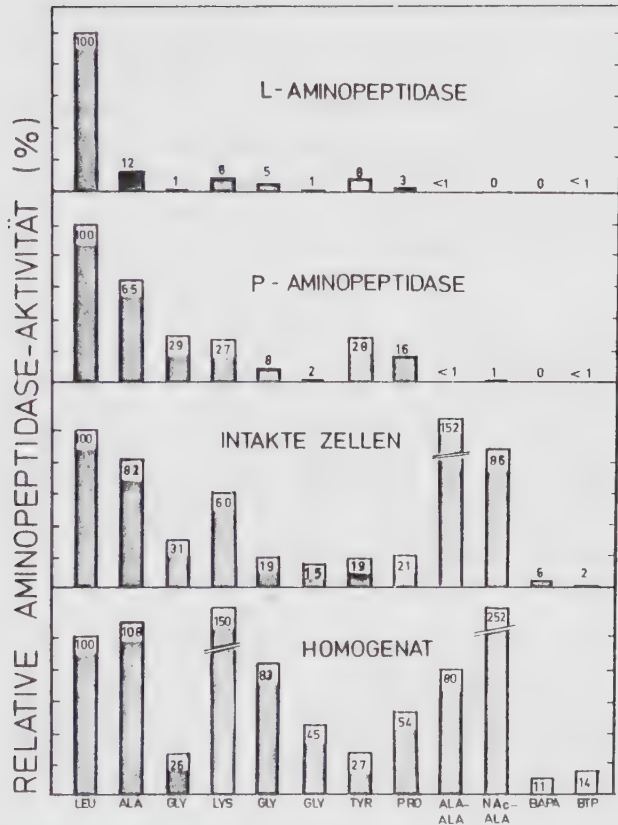


Abb.17

Vergleich der Substrat-Spezifität der gereinigten und zellgebundenen Aminopeptidase

Als Substrate dienten Aminosäure-p-nitroanilide bei 25°C und pH 7.2 (L-Enzym), pH 7.6 (P-Enzym) und pH 7.4 (Intakte Zellen und Zellhomogenat). Die Substratkonzentration betrug 2.7 mmol/l.

und N-acetylierten Aminosäure-p-nitroaniliden. Die gereinigten Enzyme erwiesen sich als reine Aminopeptidasen, während im Aktivitätsspektrum der ganzen Zellen andere Enzyme mit anderer

Spezifität miterfaßt werden.

Aus dem Vergleich mit den Homogenatwerten war es wahrscheinlich, daß die durch Lubrol solubilisierbare, als Plasmamembranenzym bekannte (11) Dipeptidyl-Aminopeptidase-Aktivität (Substrat Alanyl-alanin-p-nitroanilid) auf ein weiteres zellgebundenes Oberflächenenzym zurückzuführen ist, die mit intakten Zellen meßbare Endopeptidase-Aktivität (Substrate N-acetylierte und N-benzoylierte Aminosäure-p-nitroanilide) dagegen möglicherweise auf das "Auslaufen" eines Enzyms aus dem Zellinneren.

Direkt vergleichen läßt sich auch die Hemmung des freien und zellgebundenen Enzyms durch o-Phenanthrolin (Abb.18) und Puromycin. Beide Substanzen bewirkten eine ausgeprägte Hemmung sowohl der gereinigten als auch der in ihrer natürlichen Umgebung fixierten Aminopeptidase. Benzo-[h]-chinolin im Vergleich zu o-Phenanthrolin hatte auch auf die Aktivität des gebundenen Oberflächenenzyms keinen nennenswerten Einfluß. Die Hemmkonstante für Puromycin betrug auf den intakten Zellen 1.0 mmol/l gegenüber 0.4 mmol/l für das gereinigte P-Enzym.

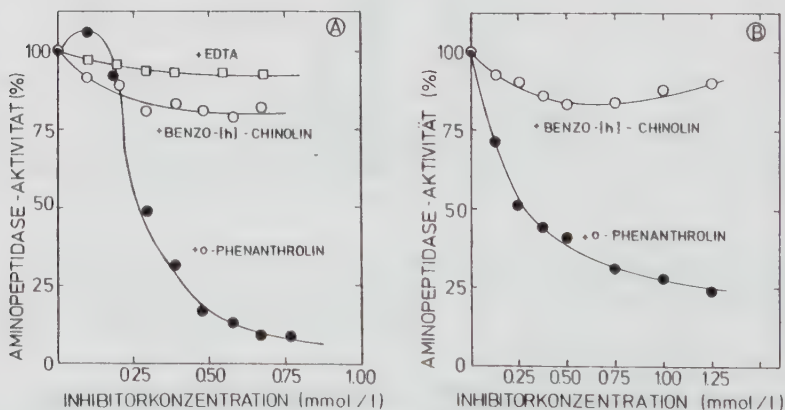


Abb.18

Hemmung der Aminopeptidase durch
o-Phenanthrolin

(A) L-Enzym (B) zellgebundenes Enzym

Die Enzymaktivitäten wurden nach Zugabe des Inhibitors bei 25°C und pH 7.2 (A) bzw. pH 7.5 (B) mit Leucin-p-nitroanilid als Substrat gemessen.

Die gegen die P-Aminopeptidase entwickelten Antikörper hemmten die Aktivität von gereinigtem und zellgebundenem Enzym (Abb.19). Bei gleichem Antikörper-Enzymaktivitäts-Verhältnis wurde das isolierte Enzym stärker gehemmt als das in der Plasmamembran fixierte. Der Grenzwert, dem die Hemmung des Enzyms durch die Antikörper zustrebt, liegt bei der zellgebundenen Aktivität mit etwa 65 - 70% Hemmung niedriger als beim gereinigten Enzym (~85%).

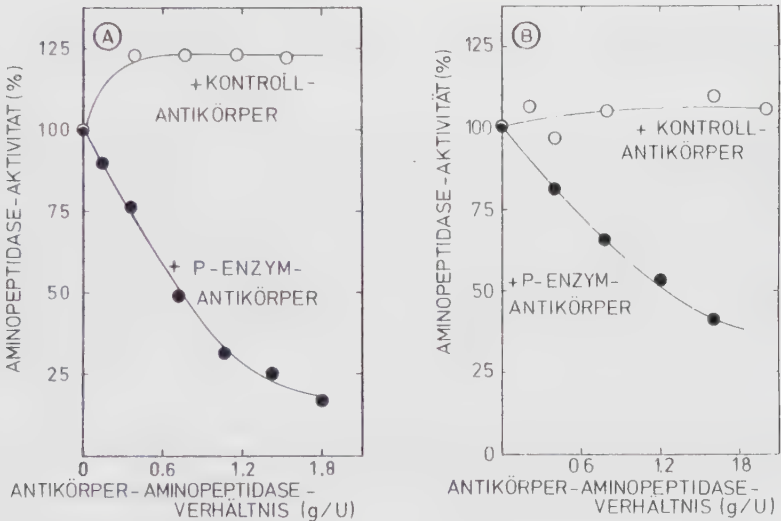


Abb.19

Hemmung der Aminopeptidase durch P-Enzym-Antikörper (s. Abb.15 und Abb.4)

(A) P-Aminopeptidase (B) zellgebundenes Enzym

Gereinigte Antikörper wurden 30 min bei 37°C mit dem Enzym bzw. den Zellen inkubiert. Danach wurde die Enzymaktivität bei 37°C mit Leucin-p-nitroanilid als Substrat gemessen.

Ein möglicher Einfluß von Lectinen auf die Enzymaktivität des Glykoproteins wurde mit der Zelloberflächen- als auch der gereinigten Aminopeptidase untersucht. Concanavalin A, Weizenkeim-

agglutinin, Sojabohnenagglutinin und ein Fucose-bindendes Protein wurden bis zu einer Konzentration von 0.4 g/l mit dem Enzym bei 37°C vorinkubiert und anschließend die enzymatische Aktivität bei 37°C mit Leucin-p-nitroanilid bestimmt. Weder isoliert noch zellgebunden wurde die Amino-peptidase durch eines der eingesetzten Lectine in ihrer enzymatischen Aktivität beeinflusst.

C DISKUSSION

Amino-peptidasen sind als Plasmamembran-komponenten verschiedener Säugetierzellen bekannt (4,19,37,38,39,75). Eine direkte Aktivitätsmessung an einer Suspension intakter Zellen - wie für die 5'-Nucleotidase und die Nucleotidpyrophosphatase (1,59,64,70) - ist bisher jedoch für dieses Enzym nicht durchgeführt worden. Die Meßbarkeit der Amino-peptidase-Aktivität an ganzen Zellen legt wie bei den nucleotidsplaltenden Enzymen die Vermutung nahe, daß ein Ekto-Enzym vorliegt. Nach DePierre und Karnovsky (14) bietet der Umsatz eines Substrats durch ganze Zellen jedoch kein ausreichendes Beweismaterial für die Ekto-Natur des die Reaktion katalysierenden Enzyms, da das Substrat ebensogut durch ein intrazelluläres Enzym umgesetzt werden könnte, wenn 1) während der Inkubation eine teilweise Lyse der Zellen eintritt oder 2) das Substrat ins Zellinnere gelangt.

Beide Möglichkeiten können für die Amino-peptidase auf AS-30D-Zellen ausgeschlossen werden:

1) Abb.3 zeigt, daß die enzymatische Hydrolyse von Glycyl-leucin auf ganzen Zellen linear mit der Zeit verläuft, das Gleiche gilt für alle mit dem Substrat Leucin-p-nitroanilid durchgeführten Versuche. Ein "Auslaufen" einer cytosolischen Amino-peptidase während der Inkubation dagegen müßte zu einem exponentiellen Anstieg der im Medium meßbaren Enzymaktivität führen. Darüber hinaus stellt das parallel durchgeführte Kontroll-experiment direkt klar, daß an der mit ganzen Zellen gemessenen Amino-peptidase-Aktivität kein im Medium gelöstes Enzym beteiligt ist (s.S.9).

2) Während der gesamten Inkubationsdauer der Zellen mit dem Substrat Glycyl-leucin tritt kein intrazelluläres Dipeptid auf. Der intrazelluläre Gehalt an radioaktiver freier Aminosäure als Reaktionsprodukt der enzymatischen Hydrolyse liegt immer erheblich unter dem extrazellulären. Um diese Befunde durch eine intrazelluläre Aminopeptidase zu erklären, müßte man eine Permeation des Dipeptids durch die Plasmamembran, ein intrazelluläres Enzym mit extrem hoher Substrataffinität und einen aktiven Aminosäuretransport nach außen postulieren. Wesentlich zwangloser lassen sich die Versuchsergebnisse aber durch eine Ekto-Aminopeptidase erklären.

Die durch enzymatische Hydrolyse von Glycyl-leucin an der Zelloberfläche entstehenden freien Aminosäuren gelangen mit der Zeit langsam ins Zellinnere. Dabei überwindet das aminoterminal Glycin die Barriere der Plasmamembran nicht schneller als das carboxyterminale Leucin. Die Vermutung einer mit der Aminopeptidase assoziierten Funktion, dem direkten Transport der abgespaltenen Aminosäure ins Zellinnere, hat sich damit nicht bestätigt.

Einen anderen Ansatz zur Demonstration der Zelloberflächenlokalisierung eines Enzyms bietet die Hemmung seiner katalytischen Aktivität durch Moleküle, die auf Grund ihrer Polarität oder ihrer Größe die Plasmamembran nicht passieren können. Solche Substanzen können nur durch Endocytose ins Zellinnere gelangen. Dies führt aber nach Verschmelzung der endocytotischen Vakuolen mit den primären Lysosomen zum Abbau der zellfremden Substanzen durch lysosomale Enzyme (66), so daß eine Reaktion mit intrazellulären Proteinen nicht mehr stattfinden kann.

Musterbeispiele für solche Moleküle, die nur an der Zelloberfläche wirken können, sind Lectine (38,63,64,70) und Antikörper (27,38,47,59,74). Um mit seinem Antikörper bzw. einem Lectin reagieren zu können, muß ein Protein in den extrazellulären Raum gerichtete antigene Determinanten bzw. Lectinrezeptoren besitzen. Führt diese Bindung zur Hemmung der katalytischen Aktivität eines zellgebundenen Enzyms, so ist anzunehmen, daß das aktive Zentrum des Enzyms in der Nähe der Bindungsstelle

und damit auf der Zelloberfläche lokalisiert ist.

Im Fall der Aminopeptidase auf AS-30D-Zellen bewirkt die Bindung der P-Enzym-Antikörper eine deutliche Hemmung der enzymatischen Aktivität (s.Abb.4), Lectine zeigen dagegen nur einen sehr geringen Effekt.

Eine weitere Substanzklasse, für die die Plasmamembran impermeabel ist, sind Enzyme. Die Markierung von Zelloberflächenkomponenten mit Hilfe von Laktoperoxidase (53) oder Galaktoseoxidase (24) wird deshalb trotz der relativen Unspezifität des Verfahrens in Bezug auf die Membrankomponente allgemein als Kriterium für deren Ekto-Natur verwendet.

Anwendung in der Zelloberflächenforschung finden auch Proteinasen (16,42,48,52,69), die relativ spezifisch manche Ekto-Enzyme von der Oberfläche intakter Zellen solubilisieren, ohne die Plasmamembran zu zerstören (s.Abb.20). Da bei der Behandlung ganzer Zellen mit Proteinasen jedoch grundsätzlich die Gefahr einer Beschädigung der Plasmamembran besteht, muß die Viabilität der Zellen während des Solubilisierungsprozesses verfolgt werden.

Im Gegensatz zu dem Detergens Lubrol PX, das sich im Solubilisierungsmechanismus gegenüber Plasmamembranproteinen grundsätzlich von den Proteinasen unterscheidet (s.Abb.20), läßt eine milde Papainbehandlung zur Solubilisierung der Aminopeptidase die AS-30D-Zellen in ihrer Viabilität beinahe unverändert (s.Abschnitt 3.3.). Die Solubilisierbarkeit der Aminopeptidase von der Oberfläche der intakten Zellen durch Papain ist ein weiteres Argument für die Ekto-Natur dieses Enzyms.

Proteine, die in der Lipid-Doppelschicht "gelöst" sind, sogenannte "integrale" (67) Membranproteine, sind prinzipiell auf zwei Wegen solubilisierbar (Abb.20)

1) Detergentien simulieren als hydrophobe Substanzen die Membranlipide und können sie als "Lösungsmittel" für die Proteine ersetzen. Solubilisiert wird das gesamte Glykoproteinmolekül, die Plasmamembran wird teilweise beschädigt.

2) Proteinasen können nicht in das Innere der Plasmamembran eindringen, sie spalten Peptidbindungen außerhalb der Lipid-Doppelschicht, die in ihrer Struktur im Idealfall unverändert bleibt. Man erhält nur den aus der Lipid-Doppelschicht in die hydrophile Umgebung ragenden, bei Ekto-Enzymen also den enzymatisch aktiven Anteil des Glykoproteinmoleküls. Ein normalerweise kurzes hydrophobes Bruchstück des Gesamtproteins bleibt in der Membran stecken.

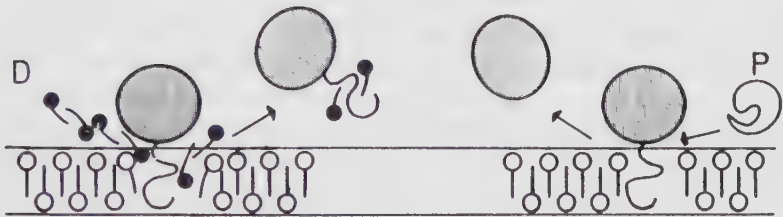


Abb.20

Schematische Darstellung der Solubilisierung von Plasmamembranproteinen durch Detergentien (D) und Proteinasen (P)

Nur das Detergens-solubilisierte Protein repräsentiert also das gesamte Membranprotein, und nur mit diesem gelang Pattus, Verger und Desnuelle ein Rekonstitutionsversuch in Liposomen (62). Das Proteinase-solubilisierte Molekül stellt dagegen den in den Extrazellulärraum gerichteten, hydrophilen Anteil des Proteins dar. Das Molekulargewicht der Proteinase-solubilisierten Proteine ist daher im allgemeinen etwas kleiner als das des Detergens-solubilisierten. Der hydrophobe Rest des Gesamt-moleküls ist für die Aminopeptidase der Darmschleimhaut von Maroux und Louvard isoliert und charakterisiert worden (54).

Beide Methoden der Solubilisierung bergen die Gefahr einer Veränderung der ursprünglichen Struktur des Enzyms in sich. Die Eigenschaften der auf verschiedenen Wegen gewonnenen, gereinigten Amino-peptidasen der AS-30D-Zellmembran unterscheiden sich teilweise beträchtlich. Ebenso zeigt das katalytische und immunologische Verhalten der isolierten Enzyme Veränderungen gegenüber denjenigen der plasmamembrangebundenen Amino-peptidase.

Die Lubrol-solubilisierete Amino-peptidase ist in ihrer Aktivität gegenüber Aminosäure-p-nitroaniliden spezifischer als das P-Enzym, man kann sie als "Leucin-Amino-peptidase" betrachten. Dagegen zeigt die P-Amino-peptidase eine breitere Spezifität und damit viel eher die Charakteristik des zellgebundenen Oberflächenenzym (s. Abb. 17). Da auch der K_m -Wert für Alanin-p-nitroanilid beim Papain-solubilisierten und membrangebundenen Enzym in der gleichen Größenordnung liegen (0.32 bzw. 0.66 mmol/l), beim L-Enzym jedoch um etwa eine Größenordnung darüber (s. S. 30), scheint die P-Amino-peptidase die enzymatischen Eigenschaften des Plasmamembranenzym unverfälschter wiederzugeben. Der höhere K_m -Wert des Zelloberflächenenzym könnte durch dessen erschwerte Zugänglichkeit für das Substrat erklärbar sein. Michaeliskonstanten anderer in der Literatur beschriebener Amino-peptidasen (81, 82) liegen in der Nähe der für das P-Enzym bestimmten Werte (s. Tab. 9), so daß man davon ausgehen kann, daß die K_m -Werte des L-Enzym unnatürlich erhöht sind.

Möglicherweise erleidet das L-Enzym im rein wäßrigen Medium strukturelle Veränderungen, die seine katalytische Wirksamkeit verringern. Der aus dem hydrophoben Bereich der Plasmamembran herausragende, enzymatisch aktive Proteinanteil bleibt dagegen bei der Papain-Solubilisierung in seiner gewohnten hydrophilen Umgebung und unterliegt offenbar keinen wesentlichen Strukturveränderungen.

Zum gleichen Ergebnis führt die Betrachtung der Hemmung der Amino-peptidase durch freie Aminosäuren. Leucin in einer Konzentration von 10 mmol/l hemmt die Hydrolyse von Glycyl-leucin an der Zell-

oberfläche erheblich stärker als Glycin (s.Abschnitt 2.1.). Den gleichen Effekt, wenn auch nicht ebenso deutlich, zeigt die Aktivität des P-Enzyms gegenüber Leucin-p-nitroanilid (s.Tab.10). L-Aminopeptidase erfährt dagegen durch beide Aminosäuren eine etwa 16 - 18%ige Hemmung.

Die Hemmung der isolierten und der membrangebundenen Aminopeptidase durch P-Enzym-Antikörper beruht auf der spezifischen Bindung der γ -Globuline an antigene Determinanten des Enzyms. Eine unspezifische Hemmung durch Antikörper, die gegen andere antigene Membranproteine entwickelt wurden, trat nicht auf (s.Abb.19). Im Fall des zellgebundenen Enzyms bedeutet dies, daß die Zelloberfläche durch die Anheftung der sperrigen Antikörpermoleküle nicht einfach sterisch abgeriegelt ist; der Zutritt des Substrats zum membrangebundenen Enzym wird durch die Bindung von γ -Globulinen anderer Spezifität nicht behindert.

Andererseits ist etwa ein Drittel der zellgebundenen Aminopeptidase-Aktivität nicht durch die spezifischen Antikörper hemmbar, aber nur 15% des isolierten Enzyms. Offensichtlich sind nicht alle in der Plasmamembran fixierten Aminopeptidasemoleküle für die großen γ -Globuline zugänglich, ein Effekt, den auch Gurd und Evans an der 5'-Nucleotidase der Leber-Plasmamembran beobachtet haben (27).

Ähnliche sterische Effekte sind wahrscheinlich auch der Grund für die schlechtere Hemmung des zellgebundenen Enzyms durch Puromycin und o-Phenanthrolin (s.S.40). Die Unmöglichkeit, Aminopeptidase-Aktivität durch trägergebundenes Papain zu solubilisieren, betont die Bedeutung sterischer Faktoren und läßt die Lokalisation des Enzyms in schmalen Einstülpungen der Plasmamembran, etwa in einer microvilli-reichen Region, vermuten.

Bestimmungen des Molekulargewichts der in der Literatur bekannten tierischen Amino-peptidasen und deren Untereinheiten differieren zum Teil beträchtlich (Tab.11):

Das Molekulargewicht der Amino-peptidase der Darmschleimhaut wurde von Kim und Brophy (37) zu 280000, das der zwei identischen Untereinheiten zu 140000 bestimmt. Zum gleichen Ergebnis kamen Wacker et al. (83) für das Nierenenzym. Wird das Enzym einer Trypsin-Behandlung unterworfen, so entstehen artefizielle kleinere Untereinheiten von 95000 und 48000 Dalton, ähnliche Bruchstücke, wie sie auch Maroux et al. (55) für das Darmschleimhautenzym fanden. Diese Bruchstücke konnte Wacker jedoch im Gegensatz zu den 140000-Einheiten nicht mehr zu einem enzymatisch aktiven Protein rekombinieren, woraus er den Schluß zieht, nur die 140000-Polypeptidketten seien die eigentlichen Untereinheiten, die kleineren Bruchstücke jedoch durch Proteolyse entstanden. Alle diese Molekulargewichtsbestimmungen wurden ohne Rücksicht auf die Glykoproteinnatur der Enzyme durchgeführt.

Unter Berücksichtigung des Zuckeranteils ermittelten Gray und Santiago (25) das Molekulargewicht zweier Amino-peptidase-Isoenzyme der Darmschleimhaut zu 320000 bzw. 180000. Amino-peptidase II besteht aus zwei α -Ketten zu 91000 Dalton, Amino-peptidase I ist ein Tetramer aus den gleichen α -Ketten und zwei β -Ketten zu 71000 Dalton, die für die katalytische Wirksamkeit ohne Bedeutung sind.

Die Amino-peptidase auf AS-30D-Zellen ist am ehesten mit dieser Amino-peptidase II zu vergleichen. Ein Molekulargewicht von 182000 fanden auch Kleine und Schubert (41) für das Nierenenzym, die identischen Untereinheiten wurden zu 47000 Dalton bestimmt.

Die Amino-peptidase aus Augenlinsen (51) besteht mit einem Molekulargewicht von 330000 aus 6 identischen Untereinheiten zu 55000.

Von den wahrscheinlich artefiziellen proteolytischen Bruchstücken und den für die Enzymaktivität unwesentlichen β -Ketten der Amino-peptidase II (Gray) abgesehen, scheinen alle diese Enzyme aus identischen Monomeren aufgebaut zu sein, die sich zu mehr oder

		Molekular- gewicht	Unterein- heiten	Zucker- anteil	Metall- enzym
Kim und Brophy (1976)	Darmschleim- haut (brush border)	280000	2x140000	19/23%	+
Maroux et al. (1973)	"	280000	3:140000, 97000, 49000	23%	2Zn/mol
Gray und Santiago (1977)	"	I 320000 II 180000	2x 91000 2x 71000 2x 91000	+	NB
Wacker et al. (1976)	Niere(mikroso- male Fraktion)	280000	2x140000 (95000, 48000)	20%	2Zn/mol
Pfleiderer et al.(1966)	"	280000	NB	NB	NB
Kleine und Schubert(1976)	"	180000	47000	NB	+
Thomas und Kinne(1972)	Niere(brush border)	140000/ 168000	NB	NB	NB
Ludewig und Hanson(1977)	Augenlinse	330000	6x 55000	NB	6Zn/mol
Diese Arbeit (1979)	AS-30D-Aescites- Hepatomzellen (Zelloberfläche)	190000/ 195000	70000	30-35%	+(Zn)

Tab.11

Physikalisch-chemische Literaturdaten
von Aminopeptidasen tierischer Zellen

weniger großen Komplexen zusammenlagern. Die Werte von 140000 Dalton erscheinen dabei wegen der Vernachlässigung des Kohlenhydratanteils als zu groß.

Für die meisten Aminopeptidasen ist deren Glykoproteinnatur nachgewiesen worden. Der Zuckeranteil beträgt zwischen 20 und 25% und liegt damit etwas unter dem abgeschätzten Wert für die Aminopeptidase auf AS-30D-Zellen. Wie diese sind die meisten Aminopeptidasen Metallenzyme (Hemmung durch spezifische Chelatbildner). Nach allen bisher vorliegenden Ergebnissen kann vermutet werden, daß jedes Aminopeptidase-Monomere ein Zinkatom gebunden enthält.

Die enzymatischen Eigenschaften der bekannten tierischen Aminopeptidasen sind weitgehend identisch mit denjenigen des Enzyms auf AS-30D-Zellen:

- Sie besitzen keine Endopeptidase-Aktivität
- Der Abbau von Oligopeptiden erfolgt schrittweise vom N-terminalen Kettenende ausgehend. Längerkettige Peptide sind die besseren Substrate (26, und Abb.11).
- Die Aminopeptidasen verfügen über eine relativ breite Spezifität bezüglich der N-terminalen Aminosäure; die bevorzugten Aminosäuren sind Leucin und Alanin (Tab.8). Michaeliskonstanten für Leucin- bzw. Alanin-p-nitroanilid liegen bei 0.2 bzw. 0.6 mmol/l (25.82, und Tab.9).
- pH-Optima für die Hydrolyse von Leucin- und Alanin-p-nitroanilid liegen zwischen pH 7 und pH 8 (in dieser Arbeit s. Abb.10), in einem Fall (81) bei pH 9.
- Schwermetallionen wirken als Inhibitoren (Tab.10), ebenso Puromycin (41, und Abb.13) und o-Phenanthrolin (37,41, und Abb.12). EDTA hemmt nur schwach (Tab.10).
- Ein Unterschied besteht in der Hemmbarkeit der Aminopeptidase durch -SH-Reagentien: Das Enzym auf AS-30D-Zellen ist bisher das einzige, welches durch p-Chloro-mercuri-phenylsulfonat signifikant inhibiert wird (Tab.10).

Ungeklärt ist bisher die biologische Funktion der Ekto-Enzyme. Als Substrate der Zelloberflächen-Aminopeptidase in vivo kommen Peptide und Proteine im Extrazellulärraum oder auf Nachbarzellen in Frage. Die schrittweise abgespaltenen Aminosäuren können im Gegensatz zu den Peptiden die Plasmamembran passieren.

Eine Aufgabe der Ekto-Aminopeptidase ist somit wahrscheinlich die sukzessive Zerlegung von für die Zelle nicht verwertbaren extrazellulären Peptiden in Aminosäuren, die ins Zellinnere gelangen und dort als Bausteine für Neusynthesen utilized werden

können. Für die Effizienz dieser Aufgabe wäre eine zusätzliche direkte Transportfunktion des Enzyms für die abgespaltene Aminosäure denkbar (55), ließ sich aber auch für die Aminopeptidase auf AS-30D-Zellen nicht nachweisen (s.S.9 und 43).

Die Zerlegung von extrazellulär auftretenden Peptiden ist für die Zelle aber möglicherweise nicht nur ein Gebot der Ökonomie. Von außen in den Organismus eingedrungene Peptide oder Proteine könnten durch die Oberflächen-Aminopeptidase abgefangen und unschädlich gemacht werden. Dem Ekto-Enzym würde damit eine Entgiftungsfunktion zukommen.

Ebenso könnte die Ekto-Aminopeptidase dafür sorgen, daß Peptidhormone nach der Erfüllung ihrer biologischen Funktion schrittweise abgebaut und damit unwirksam gemacht werden. Das Enzym wäre dann an der Regulation von Peptidhormonspiegeln beteiligt.

Theoretisch denkbar als Substrate der Ekto-Aminopeptidase wären auch Proteine auf der Oberfläche von Nachbarzellen. Möglicherweise sind diese Proteine, zu denen auch die Aminopeptidase selbst zählt, aber durch die Anordnung der Kohlenhydrat-Komponenten auf der Zelloberfläche vor einem solchen Angriff geschützt. In isolierter Form verdaut sich die Aminopeptidase der AS-30D-Zellen jedoch mit der Zeit selbst (s.S.29).

D ZUSAMMENFASSUNG

1. Auf AS-30D-Ascites-Hepatomzellen wurde eine Aminopeptidase entdeckt. Im Hinblick auf die Lokalisation des Enzyms wurde dessen Aktivität auf den intakten Zellen mit derjenigen im Zellhomogenat verglichen.
2. Durch drei verschiedene experimentelle Ansätze konnte die Ekto-Natur der Aminopeptidase demonstriert werden:
 - Mit Hilfe des radioaktiv markierten Substrats Glycyl-leucin wurde der topologische Ablauf der enzymatischen Hydrolyse verfolgt. Sie fand auf der Oberfläche intakter Zellen statt.
 - Antikörper, die gegen die gereinigte Aminopeptidase erzeugt wurden, hemmten die Enzymaktivität auf den intakten Zellen.
 - Die Aminopeptidase konnte mit Papain unter weitgehender Erhaltung der Zellviabilität von der Zelloberfläche solubilisiert werden.
3. Die Aminopeptidase konnte sowohl mit Proteinasen als auch mit Detergentien von der Zelloberfläche solubilisiert werden. Die effektivste Proteinase war Papain, das wirkungsvollste Detergens Lubrol PX. Die Viabilität der Zellen blieb jedoch nur bei der Proteinase-Behandlung weitgehend gewahrt.
4. Das Papain- und das Lubrol-solubilisierete Enzym wurde zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt. Ein wesentlicher Reinigungsschritt war in beiden Fällen die Affinitätschromatografie an Concanavalin A-Sepharose.
5. Beide Formen des Enzyms wurden als Glykoproteine identifiziert, die Molekulargewichte auf 180000 (P-Enzym) bzw. 195000 (L-Enzym) abgeschätzt. Das Enzym spaltet p-Nitroanilide von L-Aminosäuren, bevorzugt diejenigen von Leucin und Alanin. Die Michaeliskonstante gegenüber Oligopeptiden nimmt mit steigender Kettenlänge ab.

Das Enzym besitzt keine Endopeptidase-Aktivität. Inhibitoren der Amino-peptidase sind Schwermetallionen, Puromycin und o-Phenanthrolin.

6. Gegen beide Formen des Enzyms wurden im Kaninchen Antikörper erzeugt. Es zeigte sich eine mindestens teilweise immunologische Identität der auf verschiedenen Wegen gewonnenen Proteine.
7. Ein Vergleich des gereinigten Enzyms mit der auf der Zelloberfläche verankerten Amino-peptidase zeigte, daß das Papain-solubilisier-te Enzym in seinen katalytischen Eigenschaften dem zellgebundenen näherkommt als das Lubrol-solubilisier-te. Die Aktivität des isolierten Enzyms wird durch die Antikörper, durch Puromycin und o-Phenanthrolin stärker gehemmt als die der in der Plasmamembran fixierten Amino-peptidase.

E EXPERIMENTELLES

1. Enzyme und Chemikalien

Adenosin-desaminase (Adenosin-aminohydrolase, EC.3.5.4.4.)
aus Kälberdarm, 200 U/mg,
Alanin-dehydrogenase (L-Alanin:NAD⁺oxidoreductase, EC.1.4.1.1.)
aus *Bacillus subtilis*, 30 U/mg,
Laktat-dehydrogenase (L-Lactate:NAD⁺oxidoreductase, EC.1.1.1.27.)
aus Kaninchenmuskel, 550 U/mg,
Myokinase (ATP:AMP phosphotransferase, EC.2.7.4.3.)
aus Kaninchenmuskel, 360 U/mg,
Pyruvat-kinase (ATP:pyruvate 2-O-phosphotransferase, EC.2.7.1.40.)
aus Kaninchenmuskel, 200 U/mg,
Papain (EC.3.4.22.2.) aus Papaya latex, 30 U/mg,
Bromelain (EC.3.4.22.4.) aus Ananas, 6000 Einh./g,
Trypsin (EC.3.4.21.4.) aus Rinderpankreas, 33 U/mg und
Chymotrypsin (EC.3.4.21.1.) aus Rinderpankreas, 75 U/mg
wurden von Boehringer Mannheim bezogen,
Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (D-Glucose-6-phosphate:NADP⁺
1-oxidoreductase, EC.1.1.1.49.) aus Hefe, 200-400 U/mg und
Hexokinase (ATP:D-hexose-6-phosphotransferase, EC.2.7.1.1.)
aus Hefe, 300 U/mg
von Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.).

[1-¹⁴C]-Glycyl-leucin (20 Ci/mol) und Glycyl-[U-¹⁴C]-leucin
(16.1 Ci/mol) wurden bei The Radiochemical Centre (Amersham,
England) gekauft,
Swim's S-77 bei Grand Island Biological Co. (Grand Island, U.S.A.),
Pluronic F68 (71) von BASF-Wyandotte Corp. (Wyandotte, U.S.A.),
Triton X-100, PPO, POPOP, Celite 545 und α -Methyl-mannosid von
C. Roth (Karlsruhe),
1,4-Di-(2-methylstyryl)-benzol (Bis-MSB) von Koch-Light-
Laboratories Ltd (Colnbrook-Bucks, England),
Freund's Adjuvantien (complete und incomplete) von Difco Labora-
tories (Detroit, Michigan, U.S.A.),
Lubrol PX von Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.),

Sephadex-Gele, Protein A-Sepharose, Concanavalin A-Sepharose sowie Concanavalin A von Pharmacia (Uppsala, Schweden), die übrigen Lectine von Miles Laboratories Inc. Research Products (Elkhart, Indiana, U.S.A.), Benzo-[h]-chinolin von Fluka GmbH (Neu-Ulm), Rinderserumalbumin von den Behring-Werken (Marburg a.d.Lahn) und N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid-HCl von AB Bofors Nobel Division (Möln dal, Schweden).

Alle übrigen Substanzen wurden von E.Merck (Darmstadt), Boehringer Mannheim, Serva (Heidelberg) und Sigma Chemical Co. (St.Louis, Mo., U.S.A.) bezogen.

2. Methodische Grundbedingungen für Zellversuche

2.1. Zellmaterial

AS-30D-Ascites-Zellen sind von einem soliden Hepatom abgeleitet, das durch 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol in Ratten induziert wurde (68). Die Ascites-Zellen wurden in 7-10 Wochen alten weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (Voss, Tuttlingen) kultiviert. Sie wurden im 7-Tage-Rhythmus durch intraperitoneale Injektion von 0.2 ml Ascites-Flüssigkeit unter sterilen Bedingungen transplantiert. Für die Versuche wurden die Transplantationsgenerationen 270 bis 480 verwendet.

2.2. Gewinnung und Waschung der Zellen

Am 7.Tag nach der Injektion wurden die Ascites-Hepatomzellen aus dem geöffneten Bauchraum der Ratten entnommen und in Standard-Medium (s.u.) suspendiert. Sie wurden dreimal durch Zentrifugation (30 x g, 8 min, Raumtemperatur) und anschließende Resuspension im etwa 10-fachen Volumen Standard-Medium gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden sie in einem für den Versuch geeigneten iso-osmolalen Puffer aufgenommen.

2.3. Iso-osmolale Puffer

Standard-Medium (36)

- 11: 9.0g Swim's S-77
1.06g Pluronic F68 (71)
0.28g Glutamin (2 mmol/l)
0.034g Cystin·HCl (0.06 mmol/l)
4.46g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25 mmol/l)

Nach Filtration Zugabe von

0.85g NaHCO_3 (9 mmol/l)

Der pH-Wert wird mit HCl auf 7.40 bei 37°C eingestellt.

Modifizierter Hank's-Puffer

- 11: 0.40g KCl (6.8 mmol/l)
0.20g KH_2PO_4 (1.7 mmol/l)
0.10g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.5 mmol/l)
0.10g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.4 mmol/l)
8.00g NaCl (140 mmol/l)
0.28g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2 mmol/l)
0.99g Glucose·H₂O (5 mmol/l)
0.002g Phenolrot (0.006 mmol/l)

Der pH-Wert wird mit NaHCO_3 auf 7.40 bei 37°C eingestellt.

Papain-Solubilisierungs-Puffer

- 11: 6.43g NaCl (110 mmol/l)
2.07g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (15 mmol/l)
0.358g KCl (4.8 mmol/l)
0.991g Glucose·H₂O (5 mmol/l)
0.878g Cystein·HCl (5 mmol/l)

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7.0 bei 25°C eingestellt.

Lubrol-Solubilisierungs-Puffer

1l: 20.57g Tris (0.17 mol/l)

0.428g $\text{Mgac}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 mmol/l)

0.99g $\text{Glucose} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (5 mmol/l)

Der pH-Wert wird mit HCl (ca. 6 mol/l)
auf 7.3 bei 25°C eingestellt.

Für Enzymaktivitätsmessungen auf den intakten Zellen wurden außerdem Tris-HCl-Puffer (170 mmol/l Tris, 5 mmol/l Mgac_2 , 5 mmol/l Glucose) mit pH-Werten zwischen 7.3 und 7.8 verwendet.

Die Osmolalität der Medien wurde mit einem Osmometer der Firma H.Knauer und Co. (Berlin) nachgeprüft. Bei den eingesetzten Puffern lag sie zwischen 0.29 und 0.31 osm.

2.4. Zellfeuchtgewichte

Zur Bestimmung der Zellfeuchtgewichte wurden 3 oder 5 ml der Zellsuspension in zuvor ausgewogene Zentrifugengläschen pipetiert. Nach Zentrifugation bei $750 \times g$ (10 min, 4°C) wurde der Überstand abgegossen, die Wand des Zentrifugengläschens ausgewischt und das Glas mit dem Sediment erneut gewogen. Die Feuchtgewichte sind immer Mittelwerte aus 3 oder 4 Bestimmungen.

1g AS-30D-Zellen entspricht 3.0×10^8 Einzelzellen (36).

2.5. Homogenisation

Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten im Homogenat wurde die Zellsuspension 3×5 sec unter Eiskühlung beschallt (Branson-Sonifier Modell S 110, Stufe 4 kc). Das Zellhomogenat wurde direkt in die enzymatischen Tests eingesetzt.

Zur Bestimmung der Adenin-nucleotid-gehalte (Abschnitt 6.) und der Reaktionsprodukte der enzymatischen Hydrolyse von Gly-Leu (Abschnitt 13.) wurden die mit Perchlorsäure versetzten Zellsedimente in Polypropylenbechern (Ivan Sorvall, Inc., Norwalk, Conn., U.S.A.) mit Hilfe eines motorgetriebenen Teflon-Pistills homogenisiert.

3. Bestimmung von Enzymaktivitäten

3.1. Aminopeptidase

3.1.1. Aminosäure-p-nitroanilide als Substrate

Für Routinemessungen der Aminopeptidase-Aktivität wurde als Substrat Leucin-p-nitroanilid bzw. p-Nitroanilide anderer Aminosäuren eingesetzt.

Substrat-stammlösung: 0.02 mmol Aminosäure-p-nitroanilid
in 1 ml HCl (20 mmol/l) gelöst

Ansatz für den kinetischen Test:

0.1 ml Substrat (Konzentration im
Test: 3.1-3.3 mmol/l)
0.5 ml Puffer (L-Enzym: Natriumphosphat
(0.1 mol/l, pH 7.2)
P-Enzym: Tris-HCl (0.1 mol/l
Tris, pH 7.8)

5-50 µl Enzymlösung

Ansatz für den Stoptest:

0.1 ml Substrat (Konzentration im
Test: 3.3 mmol/l)
0.5 ml Puffer + Enzym
oder Zellsuspension

Stop (nach 5-15 min): 0.2 ml HgCl₂ (0.2 mol/l: Konzentration
im Test: 0.05 mol/l)

Nach Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge wurde die Extinktion im Überstand gegen einen Leerwert gemessen, bei dem HgCl₂ gleich zu Beginn der Reaktion einpipettiert worden war.

Temperatur: 25°C oder 37°C

Meßstrahlung: 405 nm

$$\epsilon_{405\text{nm}} = 9.62 \times 10^3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

(81)

3.1.2. Oligopeptide als Substrate

Substrat-stammlösungen: Alanyl-alanin, Tri-alanin, Tetra-alanin, DL-Poly-alanin (n=20) und Leucyl-alanin jeweils 0.02 mmol in 1 ml H₂O gelöst, 0.01 mmol Penta-alanin in 1 ml H₂O gelöst.

Testansatz: 0.05 ml Substrat (Konzentration im Test
(25°C) bis 1.78 bzw. 0.89 mmol/l)
0.5 ml Natriumphosphat-Puffer (0.1mol/l, pH 7.6)
+ 0.01 ml Enzymlösung
oder 0.5 ml Zellsuspension
Stop (nach 30 min): 0.1 ml HClO₄ (3 mol/l, Konzentration im Test:
0.45 mol/l)

Nach Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge wurden 0.5 ml des Überstandes mit 0.08 ml KOH (3.3 mol/l) neutralisiert und nach erneuter Zentrifugation im Überstand freigesetztes Alanin bestimmt. Zu jeder Meßreihe wurden zwei Leerwerte mit 0.05 ml H₂O statt Substrat mitangesetzt.

Enzymatische Bestimmung des freigesetzten Alanins (84):

0.1 ml Tris-HCl-Puffer
(0.1 mol/l Tris, 0.8 mol/l
Hydrazin, pH 8.5)
0.05 ml NAD⁺ (24 mmol/l, Konzentration im
Test: 1.8 mmol/l)
0.5 ml neutraler Überstand
E₀ ---
0.01 ml Alanin-dehydrogenase
(2.5 g/l, Konzentration im Test 40 mg/l)
E₁ ---

$\Delta E = E_1 - E_0$ entspricht dem freien Alanin, die Extinktionsdifferenz des Leerwerts wird abgezogen.

Temperatur: 25°C

Meßstrahlung: 334 nm

$$\epsilon_{334\text{nm}} = 6.18 \times 10^3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

3.2. Endopeptidase

3.2.1. Künstliche Substrate

Es wurden am Aminoende blockierte Aminosäure- bzw. Peptid-p-nitroanilide verwendet.

Stammlösungen: 0.010 mmol N-Acetyl-alanin-p-nitroanilid
in 1 ml HCl (20 mmol/l) gelöst
0.005 mmol N-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid·HCl
in 1 ml H₂O gelöst (bei 70°C)
0.005 mmol N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitro-
anilid·HCl in 1ml H₂O gelöst

Die Aktivitätsbestimmungen wurden wie in 3.1.1. beschrieben durchgeführt. Zur Messung der Aktivität von Papain wurde BAPA als Substrat und der Papain-Solubilisierungs-Puffer pH 6.0 verwendet.

3.2.2. Proteine als Substrate

Stammlösungen: 40 mg Hämoglobin oder Casein in 10 ml
Tris-HCl-Puffer (0.1 mol/l Tris, pH 7.4) gelöst

Testansatz: 0.5 ml Substrat
(37°C) 0.1 ml Enzymlösung

Stop (nach

30 min): 0.5 ml Trichloressigsäure (0.6 mol/l, Konzentration
im Test: 0.27 mol/l)

Nach Zentrifugation wurde im Überstand auf Folin-positives Material getestet (50). Die Leerwerte wurden bestimmt, indem die Trichloressigsäure zu Beginn der Reaktion einpipettiert wurde.

Die Proteinase-Aktivität gegenüber Azocoll wurde nach einer Literaturvorschrift (65) getestet.

3.3. γ -Glutamyltransferase

Die Aktivität der γ -Glutamyltransferase wurde analog 3.1.1. mit γ -Glutamin-p-nitroanilid als Substrat bestimmt. Als Akzeptor wurde der Substrat-stammlösung Glycyl-glycin in einer Konzentration von 0.02 mmol/l zugesetzt.

3.4. Nucleotidpyrophosphatase und Alkalische Phosphatase

Substrat-stammlösungen: 0.05 mmol p-Nitrophenyl-TMP bzw.
p-Nitrophenyl-phosphat
in 1 ml H₂O gelöst

Ansatz für den kinetischen Test:

0.02 ml Substrat (Konzentration im Test:
1.75-1.90 mmol/l)

0.5 ml Tris-HCl-Puffer (0.2 mol/l Tris,
5 mmol/l Mgac₂, pH 9.4)

5-50 µl Enzymlösung

Ansatz für den Stoptest: 0.02 ml Substrat (Konzentration im Test:
1.92 mmol/l)

0.5 ml Zellsuspension

Stop (nach 3 - 5 min): 0.2 ml HClO₄ (3 mol/l, Konzentration im
Test: 0.83 mol/l)

Nach Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge wurden 0.5 ml des Überstandes mit 0.17 ml KOH (3.3 mol/l) auf pH 9-11 gebracht und nach erneuter Zentrifugation die Extinktion gegen einen Leerwert gemessen, bei dem die Perchlorsäure gleich zu Beginn der Reaktion zugesetzt worden war.

Temperatur: 25°C

Meßstrahlung: 405nm

$$\epsilon_{405\text{nm}} = 18.5 \times 10^3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

3.5. 5'-Nucleotidase

Substrat-stammlösung: 0.05 mmol AMP in 1 ml H₂O gelöst

Ansatz: 0.01 ml Substrat (Konzentration im
Test: 0.5 mmol/l)

1.0 ml Zellsuspension

Stop (nach 20 min): 0.2 ml HClO₄ (3 mol/l, Konzentration
im Test: 0.5 mmol/l)

Nach Zentrifugation wurde 1.0 ml des Überstandes mit 0.2 ml KOH (4 mol/l) neutralisiert und nach einer weiteren Zentrifugation im Überstand Adenosin bestimmt. Ein Leerwert mit gleich zu Beginn zugegebener HClO₄ wurde mit angesetzt.

Enzymatische Bestimmung von Adenosin (57):

0.5 ml Tris-HCl-Puffer (0.1 mol/l Tris, pH 7.4)

0.2 ml neutraler Überstand

E_0 ---

25 μ l Adenosin-desaminase (0.2 g/l, Konzentration im Test: 7 mg/l)

E_1 ---

$\Delta E = E_1 - E_0$ entspricht dem freien Adenosin, die Extinktionsdifferenz des Leerwerts wird abgezogen.

Temperatur: 25°C

Meßstrahlung: 265nm $\epsilon_{265nm} = 8.1 \times 10^3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

3.6. Laktat-dehydrogenase (8)

Lösungen:

I) 8 μ mol NADH, 0.18 mmol NaHCO_3
in 1 ml H_2O gelöst

II) Kalium-phosphat-Puffer (0.05 mol/l Phosphat, 0.31 mol/l Natriumpyruvat, pH 7.5)

Testansatz:
(kinetisch) 0.5 ml Puffer (Pyruvatkonzentration im Test: 0.29 mmol/l)

0.01 ml NADH-Lösung (Konzentration im Test: 0.15 mmol/l)

0.02 ml Probe

Temperatur: 25°C

Meßstrahlung: 334nm $\epsilon_{334nm} = 6.18 \times 10^3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

3.7. Hexokinase (9)

Testlösung: 0.5 mmol Glucose, 12 μ mol ATP, 14 μ mol NADP^+ in 10 ml TRA-Puffer (0.3 mol/l TRA, 9 mmol/l Mgac_2 , pH 7.5) gelöst

Testansatz:
(kinetisch) 0.5 ml Testlösung (Konzentrationen im Test: 45 mmol/l Glucose, 1.1 mmol/l ATP, 1.25 mmol/l NADP^+)

0.01 ml Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (1 g/l, Konzentration im Test: 18 mg/l)

0.05 ml Probe

Temperatur: 25°C

Meßstrahlung: 334nm $\epsilon_{334nm} = 6.18 \times 10^3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

4. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Lowry (50) durchgeführt. Als Standard diente Rinderserumalbumin, die Proben wurden bei 578 nm vermessen.

5. Trypan-Blau-Färbung (20)

Trypan-Blau-Lösung: 5 g in 1 l Standard-Medium gelöst

0.1 ml Zellsuspension wurden mit 0.05 ml Trypan-Blau-Lösung vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 25°C wurden die gefärbten Zellen im Mikroskop gegen die nicht gefärbten ausgezählt.

6. Messung der intrazellulären Adenin-nucleotide (36)

Je 10 ml Zellsuspension wurden in 50 ml-Polypropylen-Zentrifugenbecher pipettiert, die in flüssigem Stickstoff vorgekühlt waren, und sofort bei -20°C und 750 x g 1 min zentrifugiert. Die Überstände wurden abgegossen und die Becherwände ausgewischt. Die Zellsedimente wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und zur Ent-eiweißung mit 1 ml HClO₄ (0.9 mol/l) versetzt. Bis zur Homogenisation wurden die Proben im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Nach der Homogenisation wurde bei 15000 x g (10 min, 4°C) zentrifugiert und der saure Überstand mit festem KHCO₃ neutralisiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 15000 x g (10 min, 4°C) wurde der neutrale Überstand bis zu den Metabolitbestimmungen im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

6.1. Bestimmung von ATP (44)

Testlösung: 10 µmol Glucose, 12 µmol NADP⁺ in 10 ml TRA-Puffer (0.3 mol/l, 9 mmol/l Mgac₂, pH 7.5) gelöst

Testansatz: 0.5 ml Testlösung (Konzentrationen im Test:
0.70 mmol/l Glucose, 0.85 mmol/l NADP⁺)
0.2 ml neutraler Überstand
5 µl Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (1 g/l,
Konzentration im Test: 7 mg/l)

E₀ ---

5 µl Hexokinase (1.4 g/l, Konzentration im
Test: 10 mg/l)

E₁ ---

$\Delta E = E_1 - E_0$ entspricht dem ATP-Gehalt der Probe.

6.2. Bestimmung von ADP und AMP (34)

Testlösung: 15 μmol Phosphoenolpyruvat, 4.2 μmol NADH in 9.9 ml TRA-Puffer (0.3 mol/l TRA, 9 mmol/l Mgac_2 , pH 7.5) gelöst, + 60 μl Laktat-dehydrogenase (5 g/l)

Testansatz: 0.5 ml Testlösung (Konzentrationen im Test: 1.05 bzw. 0.92 mmol/l Phosphoenolpyruvat, 0.29 bzw. 0.25 mmol/l NADH, 21 bzw. 19 mg/l Laktat-dehydrogenase) 0.2 oder 0.3 ml neutraler Überstand

E_0 ---

5 μl Pyruvat-kinase (2 g/l, Konzentration im Test: 14 bzw. 13 mg/l)

E_1 ---

5 μl Myokinase (2 g/l, Konzentration im Test: 14 bzw. 13 mg/l)

E_2 ---

$\Delta E_I = E_1 - E_0$ entspricht dem ADP-Gehalt, $1/2 \Delta E_{II} = 1/2 (E_2 - E_1)$ dem AMP-Gehalt der Probe. Zu jeder Bestimmungsreihe wurden zwei Leerwerte mit H_2O statt Probe mitangesetzt.

Temperatur: 25°C

Meßstrahlung: 334nm

$$\epsilon_{334\text{nm}} = 6.18 \times 10^3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

7. Solubilisierung der Aminopeptidase von der Zelloberfläche

7.1. Proteinasen

Die Zellen wurden in einer Verdünnung von etwa 1:50 (ca. 20 g Zellen/l) in Papain-Solubilisierungs-Puffer suspendiert und anschließend mit verschiedenen Proteinasen inkubiert, wobei Proteinase-konzentration, Inkubationszeit und -temperatur variiert wurden. Am Ende der Inkubation wurde die Viabilität der Zellen getestet, in einem zweiten Aliquot nach Zentrifugation (1100 x g, 5 min, dann 27000 x g, 30 min, 4°C) im Überstand die solubilisierte Aminopeptidase-Aktivität bestimmt.

7.2. Detergentien

Die Zellen wurden in einer Verdünnung von etwa 1:60 (ca. 16 g Zellen/l) in Lubrol-Solubilisierungs-Puffer suspendiert und 30 min im Eisbad mit verschiedenen Detergentien bei jeweils drei verschiedenen Detergens-konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde wie bei 7.1. beschrieben verfahren.

8. Reinigung der Aminopeptidase

8.1. Reinigung des Papain-solubilisierten Enzyms

Bei allen Reinigungsschritten wurde ein Tris-HCl-Puffer (0.1 mol/l Tris, 5 mmol/l Mgac₂, pH 7.8) verwendet.

8.1.1. Ammoniumsulfat-Gradienten-Solubilisierung (40)

Der solubilisierter Überstand wurde mit Celite 545 (25 g/l) versetzt und zu 80% an Ammoniumsulfat gesättigt (562 g/l). Das Präzipitat wurde in eine Chromatografie-Säule (2 x 20 cm) gefüllt; anschließend wurde mit einem linearen Ammoniumsulfat-Gradienten von 80-0% Ammoniumsulfat-sättigung absteigend eluiert. Gesamtvolumen des Gradienten: 440 ml

Pumpgeschwindigkeit: 20 ml/h

Fraktionsgröße: 6 ml

Die Fraktionen mit enzymatischer Aktivität wurden vereinigt und über eine Sephadex G-10-Säule (1 x 30 cm) entsalzt.

8.1.2. Affinitätschromatografie an Concanavalin A-Sepharose

Die entsalzte Proteinlösung wurde auf eine Concanavalin A-Sepharose-Säule (1 x 10 cm) aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit Puffer wurde mit α -Methyl-mannosid (50 mmol/l) eluiert.

Pumpgeschwindigkeit: 5 ml/h

Fraktionsgröße: 2.5 ml

Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und in einem Amicon-Druckdialysegerät (UM 10 Membran) konzentriert.

8.1.3. Semi-präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei pH 9.0, wie unter 9.1. beschrieben, in 12 mm dicken und 9 cm langen Gelen. Es wurde eine Apparatur der Firma Buchler verwendet. Pro Gel wurde 1 ml Proteinlösung aufgetragen (ca. 1 mg Protein). Nach der elektrophoretischen Trennung bei 8 mA/Gel (ca. 4h; 4°C) wurden die Gele in 1 mm dicke Scheibchen geschnitten, die über Nacht in je 1 ml Puffer eluiert wurden. Die enzymhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, im Amicon eingengt und gegen Puffer dialysiert. Das Enzym wurde bei 4°C aufbewahrt.

8.2. Reinigung des Lubrol-solubilisierten Enzyms

8.2.1. Affinitätschromatografie an Concanavalin A-Sepharose

Der solubilisierter Überstand wurde über eine Concanavalin A-Sepharose-Säule (1 x 10 cm) gepumpt (Pumpgeschwindigkeit 100 ml/h). Nach dem Waschen der Säule mit Tris-HCl-Puffer (0.1 mol/l Tris, 9 mmol/l Mgac₂, pH 7.2) wurde das Enzym mit α -Methyl-mannosid (0.2 mol/l) im gleichen Puffer eluiert.

Pumpgeschwindigkeit: 5 ml/h

Fraktionsgröße: 2.5 ml

8.2.2. Ionenaustauschchromatografie an QAE-Sephadex

Die vereinigten Fraktionen wurden auf eine mit Natrium-phosphat-Puffer (20 mmol/l, pH 7.2) äquilibrierte QAE-Sephadex-Säule (2 x 20 cm) aufgetragen. Das adsorbierte Protein wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten im gleichen Puffer von 0 - 0.5 mol/l NaCl eluiert. Gesamtvolumen des Gradienten: 240 ml

Pumpgeschwindigkeit: 5 ml/h

Fraktionsgröße: 2.5 ml

Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und im Amicon konzentriert.

8.2.3. Gelchromatografie an Sephadex G-200

Sephadex G-200 wurde in Tris-HCl-Puffer (0.1 mol/l Tris, 0.1 mol/l NaCl, 5 mmol/l Mgac₂, pH 7.0) gequollen und äquilibriert. Nach dem Auftragen des Enzyms (in 0.5 - 1.0 ml) auf die Säule (2 x 100 cm)

wurde mit dem gleichen Puffer eluiert.

Pumpgeschwindigkeit: 9 ml/h

Fraktionsgröße: 3 ml

Die enzymhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, im Amicon konzentriert und bei 4°C aufbewahrt.

9. Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

9.1. Analytische Gelelektrophoresen ohne SDS (13)

Die analytischen Elektrophoresen wurden in einer Apparatur der Firma Buchler unter Wasserkühlung durchgeführt.

Stammlösungen zur Herstellung der Gele:

I) Für Elektrophoresen bei

pH 8.0	pH 9.0	pH 10.3
3.42 g Tris	18.15 g Tris	18.15 g Tris
0.3 ml TEMED	0.3 ml TEMED	0.3 ml TEMED
mit HCl auf pH 7.5	mit HCl auf pH 8.5	mit HCl auf pH 9.3
H ₂ O, ad 100 ml	H ₂ O, ad 100 ml	H ₂ O, ad 100 ml

II) 32g Acrylamid, 1.2g N-N'-Methylenbisacrylamid, H₂O, ad 100 ml

III) 100mg Ammoniumperoxodisulfat in 100 ml H₂O

Zur Polymerisation von 8%-igen Gelen wurden die Lösungen I, II und III im Verhältnis 1:1:2 vermischt und sofort in 4 mm dicke und 8 cm lange Röhrchen gefüllt (ca. 1.5 ml/Röhrchen, Gelhöhe 6.5 cm). Um eine waagrechte Geloberfläche zu erhalten, wurde mit 0.1 ml H₂O überschichtet.

Elektrophoresepuffer:

- pH 8.0: 5.52g 5,5-Diäthylbarbitursäure, H₂O, ad 1l,
mit festem Tris auf pH 7.0 eingestellt.
- pH 9.0: 14.4g Glycin, H₂O, ad 1l,
mit festem Tris auf pH 8.0 eingestellt.
- pH 10.3: 6.0g Tris, H₂O, ad 1l,
mit festem Glycin auf pH 9.0 eingestellt.

Pro Gel wurden 20 - 25 μ l Proteinlösung (5 - 20 μ g Protein) aufgetragen, die vorher mit einem Tropfen Bromphenolblau-Lösung (2mg in 10 ml Glycerin) versetzt worden war. Die Stromstärke betrug 5 mA/Röhrchen.

Anfärbung der Gele:

Protein: 1h in Coomassie-Blau-Lösung (1.5g in 1l 7% Essigsäure);
Entfärbung in 7% Essigsäure

Kohlenhydrate:

Färbung mit Perjodat-Schiff's-Reagens (87)

Enzymaktivität:

1h bei 37°C in einer Lösung von Leucin-p-nitroanilid
(2 mmol/l) in Natrium-phosphat-Puffer (0.1 mol/l, pH 7.8
bzw. 7.2).

9.2. SDS-Gelelektrophoresen (43)

Stammlösungen:

- I) Tris-HCl-Puffer (1 mol/l, pH 8.8)
- II) 5g SDS in 100 ml H₂O
- III) 30g Acrylamid, 0.8g N-N'-Methylenbisacrylamid, H₂O ad 100 ml
- IV) Tris-HCl-Puffer (0.25 mol/l, pH 6.8)
- V) TEMED
- VI) 0.1g Ammoniumperoxodisulfat in 1 ml H₂O

Herstellung der Gele:

<u>Trenngel (13%)</u>	<u>Sammelgel (3%)</u>
11.25 ml I	0.2 ml II
0.6 ml II	1.0 ml III
13.0 ml III	5.0 ml IV
5.0 ml H ₂ O	3.8 ml H ₂ O
10 μ l V	5 μ l V
90 μ l VI	30 μ l VI

Das Trenngel wurde sofort nach dem Mischen in 4 mm dicke und 11 cm lange Röhrchen gegossen (ca. 2 ml/Röhrchen, Gelhöhe 9 cm) und mit 0.1 ml SDS-Lösung (0.1g in 100 ml H₂O) überschichtet. Nach beendeter Polymerisation wurde die überstehende Flüssigkeit abgesaugt

und das Sammelgel aufgegossen (ca. 0.2 ml, Gelhöhe 1 cm). Danach wurde wieder mit der SDS-Lösung überschichtet.

Elektrophoresepuffer: Glycin-Tris-Puffer (192 mmol/l Glycin,
25 mmol/l Tris, 1 g/l SDS, pH 8.6)

Stammlösung: 15.1g Tris, 72.0g Glycin, 5.0g SDS, H₂O, ad 500 ml.
Zum Gebrauch wird die Stammlösung 1:10 mit H₂O verdünnt.

Vorbehandlung der Proteine: Die Proteinlösungen wurden vor der Elektrophorese 1:1 mit Solubilizer (s.u.) versetzt und 30 min bei 95°C inkubiert.

SDS-Solubilizer: 4g SDS, 20mg Bromphenolblau, 10 ml Mercapto-
äthanol, 20 ml Glycerin, Tris-HCl-Puffer
(125 mmol/l Tris, pH 6.8) ad 100 ml

Für die Molekulargewichtsbestimmung dienten als Marker:

RNA-Polymerase	MG	165000, 155000, 39000
Rinderserum-		
albumin	MG	67000
Trypsin-	MG	21500
Inhibitor aus		
Sojabohnen		

Die Anfärbung der Banden erfolgte mit Coomassie-Blau wie unter 9.1. beschrieben.

10. Gelpermeationschromatografie zur Molekulargewichtsbestimmung

Sephadex G-200 wurde in Tris-HCl-Puffer (0.1 mol/l Tris, 0.1 mol/l NaCl, 5 mmol/l Mgac₂, pH 7.0) gequollen. Es wurde ein Gelbett von 2 cm Durchmesser und 100 cm Höhe hergestellt und mit dem gleichen Puffer gewaschen. 0.5 ml Amino-peptidase-lösung wurde mit Eichproteinen vermischt und auf die Säule aufgetragen. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 9 ml/h, die Fraktionsgröße 3 ml. Im Eluat wurde die Amino-peptidase durch Aktivitätsmessung, die übrigen Proteine mit einem Durchflußphotometer Uvicord II bei 280 nm bestimmt. V₀ wurde mit Dextranblau 2000 ermittelt.

Als Eichproteine wurden verwendet:

Katalase	MG	240000
Aldolase	MG	158000
Rinderserum-		
albumin	MG	67000
Ovalbumin	MG	45000
Cytochrom C	MG	12500

11. Kohlenhydratanalyse

11.1. Bestimmung der Hexosen (17)

In verschraubbare Reagensgläser wurde pipettiert:

- 0.1 ml Glykoproteinlösung bzw. Puffer
- 0.1 ml Phenol-Lösung (5g in 100 ml H₂O)
- 0.5 ml konz. H₂SO₄

Die Ansätze wurden sofort gut gemischt und die Reagensgläser 20 min im Wasserbad bei 30°C stehen gelassen. Die Extinktion wurde bei 492 nm gemessen. Es wurden jeweils mindestens zwei Leerwerte und zwei Standardwerte mitangesetzt. Als Standard diente Galaktose (0.2 mmol/l) und Trypsin-Inhibitor aus Hühner-eiweiß (0.5 g/l).

11.2. Bestimmung der N-Acetyl-hexosamine (18)

Die Glykoproteine wurden 6h in HCl (4 mol/l) bei 93°C hydrolysiert. Anschließend wurde mit KOH (4 mol/l) neutralisiert.

Lösungen:

- I) 7.42g Borsäure-KOH ad 100 ml, pH 9.2
- II) Ehrlich-Reagens: 10g Dimethylaminobenzaldehyd in HCl/Eisessig (12.5/87.5, v/v) gelöst, zum Gebrauch 1:10 mit Eisessig verdünnt
- III) Essigsäureanhydrid/Aceton (1.5/98.5, v/v)

Testansatz: 0.1 ml Probe
 0.04 ml I
 0.02 ml III
 --- 20 min bei 93°C inkubieren,
 abkühlen lassen
 0.6 ml II
 --- 20 min bei 37°C inkubieren

Die Extinktion wurde bei 585 nm gegen einen Leerwert gemessen.
Die Konzentration an N-Acetyl-hexosaminen in der eingesetzten
Lösung wurde an Hand der mit Standardwerten (Galaktosamin
0.2 mmol/l) gewonnenen Eichkurve ermittelt.

11.3. Bestimmung der Neuraminsäuren (2)

Lösungen:

- I) H_2SO_4 (1 mol/l)
- II) 267mg NaJO_4 , 0.175 ml konz. H_2SO_4 , H_2O , ad 50 ml
- III) 1g NaAsO_2 , 2.15 ml konz. HCl , H_2O , ad 50 ml
- IV) 1.44g Thiobarbitursäure-NaOH ad 100 ml, pH 9.0
- V) tert.-Butanol/ HCl (95/5, v/v)

Testansatz: 45 μl Probe
 5 μl I
 --- 30 min bei 85°C inkubieren
 25 μl II
 --- 30 min bei 37°C inkubieren
 20 μl III,
 mischen, bis Gelbfärbung verschwindet
 200 μl IV
 --- 8 min bei 95°C inkubieren,
 abkühlen lassen
 600 μl V

Nach Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge wurde bei
546 nm gegen einen Leerwert die Extinktion gemessen. Der Gehalt
an N-Acetyl-neuraminsäure der Probelösung wurde mit Hilfe einer
Eichkurve (NANA-Standard: 0.05 mmol/l und 0.005 mmol/l) berechnet.

Die Bestimmung erfaßt N-Acyl- und N-Glykoly- neuraminsäuren.

12. Immunologische Untersuchungen

12.1. Herstellung von Antiseren gegen die gereinigten Amino-peptidasen

0.15 ml Enzymlösung (ca. 75 µg Protein) wurden mit 0.15 ml komplettem Freund's Adjuvans unter Beschallung im Eisbad emulgiert. Die Emulsion wurde subcutan in den Rücken eines Kaninchens gespritzt. Im Abstand von 7 Tagen wurden dann dreimal 0.15 ml der gleichen Enzymlösung mit 0.15 ml inkomplettem Freund's Adjuvans emulgiert und injiziert. Am 6.Tag nach der letzten Injektion erfolgte die erste Blutabnahme aus dem Ohr des Kaninchens. Für spätere Blutabnahmen wurde jeweils 6 Tage vorher mit 0.1 ml Enzymlösung (ca. 50 µg Protein) + 0.1 ml inkomplettem Freund's Adjuvans geboostert.

Das geronnene Blut (30 min, 37°C) wurde über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen und anschließend zur Gewinnung eines klaren Serums zweimal bei 1000 x g (5 min, 4°C) zentrifugiert.

12.2. Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (61)

Die Immundiffusionstests wurden nach der Doppeldiffusionsmethode von Ouchterlony auf käuflichen Agaroseplatten (Hyland, Div.Travenol Laboratories, Inc., Costa Mesa, Calif., U.S.A.) durchgeführt.

10 µl Enzymlösung wurde in das mittlere, 10 - 25 µl Antiserum in die peripheren Löcher gegeben. Präzipitationslinien waren nach 24 - 48h bei 4°C sichtbar. Nach dem Waschen in NaCl-Lösung (0.15 mol/l) wurden die Gele mit Amidoschwarz (5 g in Eisessig/Methanol/H₂O, 1/4/5, v/v/v) 10 min gefärbt, anschließend in Methanol/Eisessig/Glycerin, 8/1/1, v/v/v) entfärbt.

12.3. Reinigung der IgG-Fraktionen

Zur Abtrennung der im Serum enthaltenen Amino-peptidase-Aktivität wurden die Antikörper über eine Protein A-Sepharose-Säule gereinigt. 0.3 g Protein A-Sepharose wurden in Natriumphosphat-Puffer (10 mmol/l, 0.15 mol/l NaCl, pH 7.6) gequollen und in einer Säule (1x1 cm) gewaschen. Das Antiserum wurde aufgetragen, die Säule 4h mit Puffer gespült und die IgG-Antikörper mit Essigsäure (1 mol/l) eluiert (Pumpgeschwindigkeit 5 ml/h, Fraktionsgröße 1.7 ml), wobei ein

Uvicord II Durchflußphotometer als Detektor diene (Extinktionsmessung bei 280 nm). Die Antikörper wurden im Amicon-Ultrafiltrationsgerät konzentriert, gegen Natrium-phosphat-Puffer (10 mmol/l, 0.15 mol/l NaCl, pH 7.6) dialysiert und bei -20°C aufbewahrt.

12.4. Hemmung der Aminopeptidase-Aktivität durch die gereinigten Antikörper

12.4.1. Hemmung des gereinigten P-Enzyms

Je 10 μl Enzymlösung (ca. 100 U/l) wurden mit 0.1 ml Antikörperlösung steigender Konzentration 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Aktivität mit Leucin-p-nitroanilid in Natrium-phosphat-Puffer (0.1 mol/l, pH 7.6) im Stoptest bei 37°C gemessen. Als Kontrolle diene eine Meßreihe mit einer analog hergestellten Antikörperpräparation eines gegen andere Membranproteine (Nucleotidpyrophosphatase und Alkalische Phosphatase aus Abb.7) immunisierten Kaninchens.

Die Antikörperkonzentration während der enzymatischen Reaktion betrug bis zu 2 g/l.

12.4.2. Hemmung der Enzymaktivität auf der Zelloberfläche

Die Zellen wurden in einer Verdünnung von etwa 1:500 (ca. 6×10^8 Zellen/l) in Tris-HCl-Puffer (170 mmol/l Tris, 4 mmol/l Mgac_2 , 4 mmol/l Glucose, pH 7.6) suspendiert. Je 0.3 ml Zellsuspension wurden mit 0.2 ml Antikörperlösung steigender Konzentration 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 0.05 ml Substratlösung (Leucin-p-nitroanilid) wurde die enzymatische Hydrolyse gestartet, nach 15 min Inkubationsdauer bei 37°C mit 0.2 ml HgCl_2 (0.2 mol/l, Konzentration im Test: 50 mmol/l) gestoppt.

Die Antikörperkonzentration während der enzymatischen Reaktion betrug bis zu 5 g/l, die Zellkonzentration 4×10^8 Zellen/l.

13. Messung der Spaltung von radioaktiv markiertem Glycyl-leucin durch intakte Zellen

13.1. Enzymatische Hydrolyse von $[1-^{14}\text{C}]$ Gly-Leu

AS-30D-Zellen wurden in einer Verdünnung von etwa 1:250 (ca. 1.2×10^9 Zellen/l) in modifiziertem Hank's-Puffer, der 10 mmol/l Glycin enthielt, aufgenommen. 50 ml Zellsuspension wurden in einem verschraubbaren 100 ml-Erlenmeyer-Kolben 20 min bei 37°C auf einem gyratorischen Schüttler vorinkubiert. Dabei wurde der pH-Wert der Zellsuspension mit einem Gasgemisch von 5% CO_2 in synthetischer Luft oder festem NaHCO_3 auf 7.3 - 7.5 eingestellt. Die enzymatische Hydrolyse wurde mit 10 μCi $[1-^{14}\text{C}]$ Gly-Leu (20 Ci/mol) in 40 μl H_2O und 50 μl Gly-Leu (0.266 mol/l) gestartet. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 10, 20, 30$ min wurden Proben von je 10 ml entnommen, bei 750 x g (8 min, 4°C) zentrifugiert und der abgegossene Überstand bei 4°C aufbewahrt. In den Überständen wurde sofort auf eventuell solubilisierte Aminopeptidase-Aktivität getestet.

Die abzentrifugierten Zellen wurden einmal vorsichtig mit 10 ml Hank's-Puffer (10 mmol/l Gly, 5 mmol/l Gly-Leu) gewaschen und erneut abzentrifugiert (750 x g, 8 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, die Becherwand ausgewischt, das Zellsediment mit 1 ml HClO_4 (0.6 mol/l) versetzt, homogenisiert und 10 min im Eisbad stehen gelassen. Anschließend wurde bei 15000 x g (10 min, 4°C) zentrifugiert und der saure Überstand mit festem KHCO_3 neutralisiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 15000 x g (10 min, 4°C) wurde der neutrale Überstand bei -20°C aufbewahrt.

Die Gesamtradioaktivität jeder Probe wurde in Triton-Toluol-Szintillator (0.4g POPOP, 4g PPO in 1l Toluol + 1l Triton X-100) gezählt (0.05 ml Probe in 10 ml Szintillator).

13.2. Enzymatische Hydrolyse von Gly- $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ Leu

Der Versuch wurde wie in 13.1. beschrieben mit Gly- $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ Leu (16 Ci/mol) als Substrat ausgeführt. Dem Puffer war in diesem Fall 10 mmol/l Leucin statt Glycin zugesetzt.

13.3. Radiopapierchromatografische Trennung und Analyse der Reaktionsprodukte

Je 0.2 ml der Proben wurden auf Whatman 3MM-Chromatografiepapier aufgetragen und absteigend chromatografiert. Als Laufmittel wurde für das System Gly/Gly-Leu n-Propanol/H₂O (7/3, v/v), für das System Leu/Gly-Leu n-Butanol/Pyridin/HCl (0.1 mol/l) (5/3/2, v/v/v) verwendet. Die Laufzeiten betrugen 16 oder 12 Stunden für Gly/Gly-Leu bzw. 18 Stunden für Leu/Gly-Leu. Zur Identifizierung der Produkte wurde auf Referenzbahnen unmarkiertes Glycin, Leucin und Glycyl-leucin mitchromatografiert und mit Ninhydrin-Spray entwickelt.

Die Papierstreifen mit dem radioaktiven Material wurden in 1 cm breite Streifen geschnitten und in 10 ml Toluol-Szintillator (0.08g 1,4-Di-(2-methylstyryl)-benzol (Bis-MSB), 3.92g PPO in 1l Toluol) gezählt. Die benutzten Flüssigszintillationszählgeräte waren ein Packard Tri-Carb 3380 und ein Beckman LS-3133.

F LITERATUR

- 1 Abney, E.R., Evans, W.H., und Parkhouse, R.M.E.,
Location of Nucleotide Pyrophosphatase and Alkaline
Phosphodiesterase Activities on the Lymphocyte Surface Membrane,
Biochem.J., 159, 293-299 (1976)
- 2 Aminoff, D.,
Methods for the Quantitative Estimation of N-Acetylneuraminic
Acid and their Application to Hydrolysates of Sialomucoids,
Biochem.J., 81, 384-392 (1961)
- 3 Andrews, P.,
Estimation of Molecular Size and Molecular Weights of Biolo-
gical Compounds by Gel Filtration. In: Methods of Biochemical
Analysis, Vol. 18, pp. 1-53 (1970) D. Glick (ed.) Interscience
Publishers, New York
- 4 Aoyagi, T., Suda, H., Nagai, M., Ogawa, K., Suzuki, J., Takeuchi, T., und
Umezawa, H.,
Aminopeptidase Activities on the Surface of Mammalian Cells,
Biochim. Biophys. Acta, 452, 131-143 (1976)
- 5 Atkinson, D.E., und Walton, G.M.,
Adenosine Triphosphate Conservation in Metabolic Regulation,
J. Biol. Chem., 243, 3239-3241 (1967)
- 6 Behal, F.J., Klein, R.A., und Dawson, F.B.,
Separation and Characterization of Aminopeptidase and Aryl-
amidase Components of Human Liver,
Arch. Biochem. Biophys., 115, 545-554 (1966)
- 7 Behal, F.J., und Story, M.N.,
Arylamidase of Human Kidney,
Arch. Biochem. Biophys., 131, 74-82 (1969)

- 8 Bergmeyer, H.U.,
Lactat-Dehydrogenase. In: H.U.Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, 3.Auflage 1974, pp.512-513, Verlag Chemie, Weinheim
- 9 Bergmeyer, H.U.,
Hexokinase. In: H.U.Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, 3.Auflage 1974, pp.502-503, Verlag Chemie, Weinheim
- 10 Bischoff, E., Wilkening, J., Tran-Thi, T.-A., und Decker, K.,
Differentiation of the Nucleotide Pyrophosphatase of Rat-Liver Plasma Membrane and Endoplasmic Reticulum by Enzymic Iodination,
Eur.J.Biochem., 62, 279-283 (1976)
- 11 Booth, A.G., und Kenny, A.J.,
Proteins of the Kidney Microvillus Membrane,
Biochem.J., 159, 395-407 (1976)
- 12 Bretscher, M.S.,
Major Human Erythrocyte Glycoprotein Spans the Cell Membrane,
Nature New Biol., 231, 229-232 (1971)
- 13 Brühmüller, M., Möhler, H., und Decker, K.,
Covalently Bound Flavin in D-6-Hydroxynicotine Oxidase from Arthrobacter oxidans. Purification and Properties of D-6-Hydroxynicotine Oxidase,
Eur.J.Biochem., 29, 143-151 (1972)
- 14 DePierre, J.W., und Karnovsky, M.L.,
Plasma Membranes of Mammalian Cells. A Review of Methods for their Characterization and Isolation,
J.Cell Biol., 56, 275-303 (1973)
- 15 DePierre, J.W., und Karnovsky, M.L.,
Ecto-Enzymes of the Guinea Pig Polymorphonuclear Leukocyte,
J.Biol.Chem., 249, 7111-7120 (1974)

- 16 Droege, W., Strominger, J. L., Singh, P. P., und Lüderitz, G.,
Surface Carbohydrate Composition of Different Types of
Chicken Lymphocytes,
Eur. J. Biochem., 54, 301-306 (1975)
- 17 Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., und Smith, F.,
Colorimetric Method for Determination of Sugars and
Related Substances,
Analyt. Chem., 28, 350-356 (1956)
- 18 Elson, L. A., und Morgan, W. T. J.,
A Colorimetric Method for the Determination of Glucosamine
and Chondrosamine,
Biochem. J., 27, 1824 (1933)
- 19 Emmelot, P., Visser, A., und Benedetti, E. L.,
Studies on Plasma Membranes VII. A Leucyl- β -naphthylamidase
Containing Repeating Unit on the Surface of Isolated Liver
and Hepatoma Plasma Membranes,
Biochim. Biophys. Acta, 150, 364-375 (1968)
- 20 Evans, H. M., und Schuleman, W.,
The Action of Vital Stains Belonging to the Benzidine Group,
Science, 39, 443-454 (1914)
- 21 Farber, E.,
ATP and Cell Integrity,
Federation Proc., 32, 1534-1539 (1973)
- 22 Fittkau, S., Förster, U., Pascual, C., und Schunck, W.-H.,
Bovine-Lens Leucine Aminopeptidase,
Eur. J. Biochem., 44, 523-528 (1974)
- 23 Frey, J., und Röhm, K. H.,
Peptidase of Yeast: Subcellular Localization and Behaviour
during the Growth Cycle,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 358, 1202-1203 (1977)

- 24 Gahmberg, C.G., und Hakomori, S.-I.,
External Labelling of Cell Surface Galactose and Galactos-
amine in Glycolipid and Glycoprotein of Human Erythrocytes,
J.Biol.Chem., 248, 1311-1317 (1973)
- 25 Gray, G.M., und Santiago, N.A.,
Intestinal Surface Amino-oligopeptidases. I. Isolation of
two Weight Isomers and their Subunits from Rat Brush Border,
J.Biol.Chem., 252, 4922-4928 (1977)
- 26 Gray, G.M., und Santiago, N.A.,
Intestinal Surface Amino-oligopeptidases. II. Substrate
Kinetic and Topography of the Active Site,
J.Biol.Chem., 252, 4929-4934 (1977)
- 27 Gurd, J.W., und Evans, W.H.,
Distribution of Liver Plasma Membrane 5'-Nucleotidase as
Indicated by its Reaction with Anti-Plasma Membrane Serum,
Arch.Biochem.Biophys., 164, 305-311 (1974)
- 28 Haase, W., Schäfer, A., Murer, H., Koepsell, H., und Kinne, R.,
Orientation of Renal Brush Border Membrane Vesicles,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem., 358, 242 (1977)
- 29 Hanson, H., Gläßer, G., und Kirschke, H.,
Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem., 340, 107-125 (1965)
- 30 Helenius, A., und Simons, K.,
Solubilization of Membranes by Detergents,
Biochim.Biophys.Acta, 415, 29-79 (1975)
- 31 Himmelhoch, S.R.,
Leucine Aminopeptidase: A Zinc Metalloenzyme,
Arch.Biochem.Biophys., 134, 597-602 (1969)

- 32 Holdsworth,G.,und Coleman,R.,
Plasma-Membrane Components Can be Removed from Isolated
Lymphocytes by the Bile Salts Glycocholate and Taurocholate
without Cell Lysis,
Biochem.J.,158,493-495 (1976)
- 33 Inoue,M.,Horiuchi,S.,und Morino,Y.,
 γ -Glutamyl-Transpeptidase in Rat Ascites Tumor Cell LY-5,
Eur.J.Biochem.,78,609-615 (1977)
- 34 Keppler,D.,
Bestimmung von 5'-Nucleotiden als Nucleosid-5'-monophosphate,
In: H.U.Bergmeyer (Hrsg.), Methoden der enzymatischen Analyse,
3.Auflage 1974, pp.2138-2146, Verlag Chemie,Weinheim
- 35 Keppler,D.,Abbate,M.J.,und Smith,D.F.,
Nucleotide Hydrolysis on the Surface of Ascites Hepatoma Cells
Tenth International Congress of Biochemistry, Hamburg,
Abstract 10-6-280, p.500 (1976)
- 36 Keppler,D.O.R.,und Smith,D.F.,
Nucleotide Contents of Ascites Hepatoma Cells and Their
Changes Induced by D-Galactosamine,
Cancer Res.,34,705-711 (1974)
- 37 Kim,Y.S.,und Brophy,E.J.,
Rat Intestinal Brush Border Membrane Peptidases
I. Solubilization, Purification, and Physicochemical
Properties of two Different Forms of the Enzyme,
J.Biol.Chem.,251,3199-3205 (1976)
- 38 Kim,Y.S.,Brophy,E.J.,und Nicholson,J.A.,
Rat Intestinal Brush Border Membrane Peptidases
II. Enzymatic Properties, Immunochemistry, and Interactions
with Lectins of two Different Forms of the Enzyme,
J.Biol.Chem.,251,3206-3212 (1976)

- 39 Kim,Y.S.,Kim,Y.W.,und Sleisinger,M.H.,
Studies on the Properties of Peptide Hydrolases in the
Brush-Border and Soluble Fractions of Small Intestinal
Mucosa of Rat and Man,
Biochim.Biophys.Acta,370,283-296 (1974)
- 40 King,T.P.,
Separation of Proteins by Ammonium Sulfate Gradient
Solubilization,
Biochemistry,11,367-371 (1972)
- 41 Kleine,R.,und Schubert,J.,
Isolierung und Charakterisierung einer mikrosomalen
Arylaminopeptidase aus Rattennieren,
Acta biol.med.germ.,35,379-391 (1976)
- 42 Kocemba-Sliwowska,U.,und Kawiak,J.,
Liberation of Cell Surface Material by the Insoluble
Trypsin Derivative,
Acta Biochim.Pol.,20,113-118 (1973)
- 43 Lämmlí,U.K.,
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of
the Head of Bacteriophage T4,
Nature,227,680-685 (1970)
- 44 Lamprecht,W.,und Trautschold,I.,
Adenosin-5'-triphosphat. Bestimmung mit Hexokinase und
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. In: H.U.Bergmeyer (Hrsg.),
Methoden der enzymatischen Analyse, 3.Auflage 1974,
pp.2151-2160, Verlag Chemie, Weinheim
- 45 Lazdunski,A.,Murgier,M.,und Lazdunski,C.,
Evidence for an Amino peptidase Localized Near the Cell
Surface of Escherichia Coli,
Eur.J.Biochem.,60,349-355 (1975)

- 46 Lorentz,K.,Petersen,S.,und Ritter,U.,
Umsatz von L-Aminosäure-nitroaniliden durch Arylamidasen.
Untersuchungen über Arylamidasen menschlicher Gewebe.
II,Mitteilung,
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.,13,45-48 (1975)
- 47 Louvard,D.,Maroux,S.,und Desnuelle,P.,
Topological Studies on the Hydrolases bound to the
Intestinal Brush Border Membrane. II. Interactions of
free and bound Aminopeptidase with a Specific Antibody,
Biochim.Biophys.Acta,389,389-400 (1975)
- 48 Louvard,D.,Maroux,S.,Vannier,Ch.,und Desnuelle,P.,
Topological Studies on the Hydrolases bound to the
Intestinal Brush Border Membrane. I. Solubilization
by Papain and Triton X-100,
Biochim.Biophys.Acta,375,236-248 (1975)
- 49 Louvard,D.,Semeriva,M.,und Maroux,S.,
The Brush-Border Intestinal Aminopeptidase, a Transmembrane
Protein as Probed by Macromolecular Photolabelling,
J.Mol.Biol.,106,1023-1035 (1976)
- 50 Lowry,O.H.,Rosebrough,N.J.,Farr,A.L.,und Randall,R.J.,
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent,
J.Biol.Chem.,193,265-275 (1951)
- 51 Ludewig,M.,und Hanson,H.,Kiseler,N.A.,Stol'mashchuk,V.Ya.,
und Tsuprun,V.L.,
On the Quaternary Structure of Leucine Aminopeptidase,
Acta biol.med.germ.,36,157-165 (1977)
- 52 Maestracci,D.,
Enzymic Solubilization of the Human Intestinal Brush
Border Enzymes,
Biochim.Biophys.Acta,433,469-481 (1976)

- 53 Marchalonis, J.J.,
An Enzymatic Method for the Trace Iodination of
Immunoglobulins and other Proteins,
Biochem.J., 113, 299-305 (1969)
- 54 Maroux, S., und Louvard, D.,
On the Hydrophobic Part of Aminopeptidase and Maltases which
Bind the Enzyme to the Intestinal Brush Border Membrane,
Biochim.Biophys.Acta, 419, 189-195 (1976)
- 55 Maroux, S., Louvard, D., und Baratti, J.,
The Aminopeptidase from Hog Intestinal Brush Border,
Biochim.Biophys.Acta, 321, 282-295 (1973)
- 56 Masuda, T., Hayashi, R., und Hata, T.,
Aminopeptidases in the Acidic Fraction of the Yeast
Autolysate,
Agr.Biol.Chem., 39, 499-505 (1975)
- 57 Möllering, H., und Bergmeyer, H.U.,
Adenosin. In: H.U.Bergmeyer (Hrsg.), Methoden der enzymati-
schen Analyse, 3.Auflage 1974, pp.1967-1970, Verlag Chemie,
Weinheim
- 58 Murgier, M., Pelissier, C., Lazdunski, A., Bernadac, A., und
Lazdunski, C.,
Aminopeptidase N from Escherichia Coli,
Eur.J.Biochem., 74, 425-433 (1977)
- 59 Newby, A.C., Luzio, J.P., und Hales, C.N.,
The Properties and Extracellular Location of 5'-Nucleotidase
of the Rat Fat-Cell Plasma-Membrane,
Biochem.J., 146, 625-633 (1975)
- 60 Nicolson, G.L.,
Transmembrane Control of the Receptors on Normal and Tumor
Cells. I. Cytoplasmic Influence over Cell Surface Components,
Biochim.Biophys.Acta, 457, 57-108 (1976)

- 61 Ouchterlony, Ö.,
Antigen-Antibody Reactions in Gels,
Acta Pathol. Microbiol. Scan., 26, 507-515 (1949)
- 62 Pattus, F., Verger, R., und Desnuelle, P.,
Comparative Study of the Interactions of the Trypsin and
Detergent Form of the Intestinal Aminopeptidase with Liposomes,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 69, 718-723 (1976)
- 63 Podolsky, D. K., Weiser, M. M., LaMont, J. T., und Isselbacher, K. J.,
Galactosyltransferase and Concanavalin A Agglutination
of Cells,
Proc. Natl. Acad. Sci., 71, 904-908 (1974)
- 64 Riordan, J. R., und Slavik, M.,
Interactions of Lectins with Membrane Glycoprotein. Effects
of Concanavalin A on 5'-Nucleotidase,
Biochim. Biophys. Acta, 373, 356-360 (1974)
- 65 Saheki, T., und Holzer, H.,
Comparison of the Tryptophan Synthase Inactivating Enzymes
with Proteinases from Yeast,
Eur. J. Biochem., 42, 621-626 (1974)
- 66 Silverstein, S. C., Steinman, R. M., und Cohn, Z. A.,
Endocytosis,
Ann. Rev. Biochem., 46, 669-722 (1977)
- 67 Singer, S. J., und Nicolson, G. L.,
The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes,
Science, 175, 720-731 (1972)
- 68 Smith, D. F., Walborg, E. F., Jr., und Chang, J. P.,
Establishment of a Transplantable Ascites Variant of a Rat
Hepatoma Induced by 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene,
Cancer Res., 30, 2306-2309 (1970)

- 69 Starling, J.J.,
Isolation and Partial Chemical Characterization of a Papain
Released Glycopeptide-Containing Fraction from the Surface
of Ehrlich Ascites Tumor Cells which Possess Concanavalin A
Binding Sites,
Masters Thesis, Florida State University, 1973, Tallahassee,
U.S.A.
- 70 Stefanovic, V., Mandel, P., und Rosenberg, A.,
Ecto-5'-nucleotidase of Intact Cultured C6 Rat Glioma Cells,
J. Biol. Chem., 251, 3900-3905 (1976)
- 71 Swim, H.E., und Parker, R.F.,
Effect of Pluronic F68 on Growth of Fibroblasts in
Suspensions on Rotary Shaker,
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 103, 252-254 (1960)
- 72 Tamura, Y., Niinobe, M., Arima, T., Okuda, H., und Fujii, S.,
Aminopeptidases and Arylamidases in Normal and Cancer Tissues
in Humans,
Cancer Res., 35, 1030-1034 (1975)
- 73 Takesue, Y.,
Purification and Properties of Leucine β -Naphthylamidase
from Rabbit Small-Intestinal Mucosal Cells,
J. Biochem., 77, 103-115 (1975)
- 74 Takesue, Y., und Nishi, Y.,
Topographical Relationship between Sucrase and Leucine
 β -Naphthylamidase on the Microvilli Membrane of Rabbit
Intestinal Mucosal Cells,
J. Biochem., 79, 479-488 (1976)
- 75 Thomas, L., und Kinne, R.,
Studies on the Arrangement of Aminopeptidase and Alkaline
Phosphatase in the Microvilli of Isolated Brush Border of
Rat Kidney,
Biochim. Biophys. Acta, 255, 114-125 (1972)

- 76 Thompson, G.A., und Carpenter, F.H.,
Leucine Amino peptidase (Bovine Lens),
J.Biol.Chem., 251, 53-60 (1976)
- 77 Trams, E.G., und Lauter, C.J.,
On the Sidedness of Plasma Membrane Enzymes,
Biochim.Biophys.Acta, 345, 180-197 (1974)
- 78 Tsai, C.S., und Matheson, A.T.,
Purification and Properties of a Ribosomal Peptidase from
Escherichia Coli B,
Can.J.Biochem., 43, 1643-1648 (1965)
- 79 Vallee, B.L.,
Metal and Enzyme Interactions: Correlation of Composition,
Function, and Structure. In: The Enzymes, 2nd edition 1960,
Vol. 3, pp.225-276, P.D.Boyer, H.Lardy, K.Myrbäck (ed.).
Academic Press, New York
- 80 Vogt, V.M.,
Purification and Properties of an Amino peptidase from
Escherichia Coli,
J.Biol.Chem., 245, 4760-4769 (1970)
- 81 Wachsmuth, E.D., Fritze, I., und Pfeleiderer, G.,
An Amino peptidase Occurring in Pig Kidney,
Biochemistry, 5, 169-182 (1966)
- 82 Wacker, H., Lehky, P., Fischer, E.H., und Stein, E.A.,
Physical and Chemical Characterization of Pig Kidney
Particulate Amino peptidase,
Helv.Chim.Acta, 54, 473-485 (1971)
- 83 Wacker, H., Lehky, P., Vanderhaeghe, F., und Stein, E.A.,
On the Subunit Structure of Particulate Amino peptidase
from Pig Kidney,
Biochim.Biophys.Acta, 429, 546-554 (1976)

- 84 Williamson, D.H.,
L-Alanin. Bestimmung mit Alanin-Dehydrogenase. In:
H.U.Bergmeyer (Hrsg.), Methoden der enzymatischen Analyse,
3.Auflage 1974, pp.1634-1637, Verlag Chemie, Weinheim
- 85 Wolf, D.H., und Holzer, H.,
Proteolysis in Yeast. In: Transport and Utilization of
Amino Acids, Peptides and Proteins by Microorganisms,
J.W.Payne (ed.) 1977, J.Wiley & Sons Limited, Chichester,
England
- 86 Yang, L.-M., und Somerville, R.L.,
Purification and Properties of a New Aminopeptidase from
Escherichia Coli K12,
Biochim.Biophys.Acta, 445, 406-419 (1976)
- 87 Zacharius, R.M., Zell, E.T., Morrison, J.H., und Woodlock, J.J.,
Glycoprotein Staining following Electrophoresis on
Acrylamide Gels,
Analyt.Biochem., 30, 148-152 (1969)

Herrn Prof.Dr.D.Keppler danke ich für die Überlassung des
Themas und die Einführung in die Problematik. Für Anregungen
und Diskussionen bin ich ihm - sowie den Herren Prof.Dr.D.F.
Smith und Dr.E.-G. Afting - sehr zu Dank verpflichtet.

Bei allen meinen Arbeitskollegen bedanke ich mich für ihr
freundschaftliches Verhalten und ihre Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Frl.G.Bennewitz für die Hilfe bei
der Anfertigung des Manuskripts.

Lebenslauf:

2.12.1948	geboren in Singen
1954-1958	Volksschule in Grünwald/München
1958-1967	Theodolinden-Gymnasium in München-Harlaching
1967	Reifeprüfung
1967-1973	Studium der Chemie in München und Freiburg
1969	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
1973	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
1973	Diplomarbeit im Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg unter der Leitung von Prof.Dr.Ch.Rüchardt
1973-1978	Doktorarbeit im Biochemischen Institut der Universität Freiburg unter der Leitung von Prof.Dr.D.Keppler

